

2P081

## 電場誘起によるポリマー結合金ナノロッドの ヘキサゴナル集合構造の形成

(愛知教育大<sup>1</sup>, 千葉大院融合<sup>2</sup>) ○日野和之<sup>1</sup>, 森川功規<sup>1</sup>, 鬼塚久生<sup>1</sup>, 畠山義清<sup>2</sup>

### Formation of the hexagonal structure of polymer-capped gold nanorods induced by an external electric field

(Aichi Univ. of Edu.<sup>1</sup>, Grad. Sch. of Adv. Integ. Sci., Chiba Univ.<sup>2</sup>)

○Kazuyuki Hino<sup>1</sup>, Kouki Morikawa<sup>1</sup>, Hisao Oniduka<sup>1</sup>, Yoshikiyo Hatakeyama<sup>2</sup>

**【序】**我々は昨年度、ポリスチレンチオール(ポリマーチオールと略称,  $M_n=5.3 \times 10^4$ ,  $M_w/M_n=1.06$ )が結合した金ナノロッドに対して、外部電場の印加によるその集合構造の変化を小角X線散乱(SAXS)測定により検討した。SAXS法は、ナノ粒子の大きさ、形、そして集合構造に関する情報を与える。外部電場を印加して、ナノロッドを電場方向に配列させることができれば、電場方向にはロッド末端面が向くことでX線散乱に寄与する試料の実効体積が減少する。そのため、試料からのSAXS強度は減少する。昨年度は、ポリマー結合金ナノロッドを低分子量ポリスチレンに溶解した溶液に対して、電場印加によるSAXS強度の減少を確認したが、距離分布関数(DDF)の形状の変化を確認することはできなかった。

今回、オレイン酸ナトリウム-セチルトリメチルアンモニウムブロミド(NaOL-CTAB)系の2成分界面活性剤を用いたシード成長法によって金ナノロッドを作製することで、これまでの作製方法よりも形状やサイズの均一性を向上させることができた[1]。本研究では、これにポリマーチオールを結合させた金ナノロッドのトルエン溶液に対して、外部電場を印加しながら、吸収スペクトルおよびSAXS測定を行う。SAXSプロファイルおよびDDF解析を行うことで、電場印加によって誘起される金ナノロッドの集合構造の形成を調べることを目的とする。

**【実験】**NaOL-CTAB系の2成分界面活性剤と規定量の $\text{AgNO}_3$ の存在下、 $\text{HAuCl}_4$ を穏やかに還元し、そこに規定量の濃 $\text{HCl}$ を加えた。それからアスコルビン酸を加えて激しく攪拌した後にシード溶液を加えて金ナノロッドを成長させた。金ナノロッドのアスペクト比(AR, 長軸の長さ/短軸の長さ)は、界面活性剤の混合比、 $\text{AgNO}_3$ 量、濃 $\text{HCl}$ 量を調整することにより制御した。シード成長法により作製した金ナノロッドの水溶液とポリマーチオールのTHF溶液を混合し攪拌させた。金ナノロッドの周りを保護している界面活性剤がポリマーチオールに置換されると、金ナノロッドの溶解度が減少し沈殿が生じた。これを回収し、過剰のポリマーチオールをTHF-水混合溶媒で洗浄した。減圧乾燥後、試料をトルエンに溶解させた。試料の分散状態はTEM観察により確かめた。続いて、2枚のITO蒸着ガラス基板(厚さ $150 \mu\text{m} \times 2$ )をスペーサーをはさんで貼り合わせて作製した電場印加用のセル(光路長 $300 \mu\text{m}$ )に試料を入れ、直流電圧を0 Vから1500 Vまで印加して、吸収スペクトルおよびSAXS強度の変化を測定した。さらに、電場OFF後の緩和過程も調べた。SAXS測定はPhoton Factory BL-6Aで行った。

**【結果と考察】**ポリマー結合金ナノロッドの溶媒として低極性で低分子量ポリスチレンに比べてナノロッドの可動性が大きいと考えられるトルエンを選択した。なぜならば、極性の高い溶媒中では、電場を印加すると溶媒分子が電場と逆方向に並び合うことで反電場が発生し、印加電場を

打ち消して電場強度が十分に稼げないからである。

図1にAR4ポリマー結合金ナノロッドトルエン溶液の吸収スペクトルの電場変化を示す。電場強度を上げると、短軸のプラズモン吸収ピークはわずかに増大し、長軸のプラズモン吸収ピークは大きく減少した。また、電場を切ると元の吸光度まで回復した。次に、AR4ポリマー結合金ナノロッドのSAXSプロファイルの電場変化を示す(図2)。電場強度の増加に対応してSAXS強度の系統的な減少を観測した。電場OFF後に、SAXSプロファイルは大きく変化し、ナノロッドが蜂の巣状に配置したヘキサゴナル構造に対応するピークを確認した( $q_1:q_2:q_3=1:\sqrt{3}:2$ )。その後、時間とともにSAXS強度は回復した。一方、AR4ナノロッド試料のトルエン溶液をTEMグリッドに滴下して固定し、TEM観察を行った。その結果、金ナノロッドが溶液の流れに沿って層状に並び合ったスメクチック配向を確認した(図3)。これらを合わせて考えると、外部電場の印加により、トルエン溶液に均一に分散していた金ナノロッドが中心から周りに拡がり、電場を切って再び分散するときにヘキサゴナル集合構造を形成し、スメクチック配向をとる。その後拡散により集合構造は消失すると考えられる。

AR6ポリマー結合金ナノロッドの場合には、SAXSプロファイルから求めたDDFの形状が電場印加中に電場強度の増加とともに変化し、長距離側にシフトした(図4)。DDFはナノ粒子の集合構造を実空間で表すものであり、ゼロの軸との交点からは試料の最大長(長軸の長さ)が求められる。DDFの変化の様子について考察するために、AR6ナノロッド試料のTEM観察を行ったところ、金ナノロッドは層状ではないが全体の向きがそろったネマチック配向をとることが分かった(図5)。したがって、AR6ナノロッドの場合には、電場印加中にネマチック配向をとり、見かけの最大長が大きく変化すると考えられる。今後の課題として、集合構造のAR依存性を調べることを計画している。

【参考文献】

[1] X. Ye, C. Zheng, J. Chen, Y. Gao, C. B. Murray, *Nano Lett.* 13, 765 (2013).

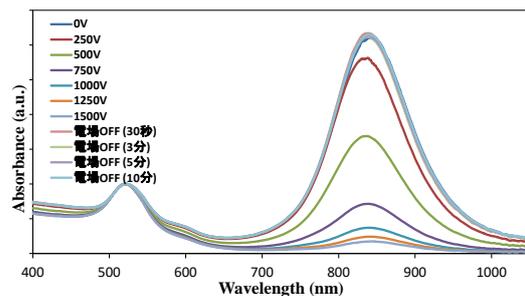


図1. AR4ポリマー結合金ナノロッドの吸収スペクトルの電場変化

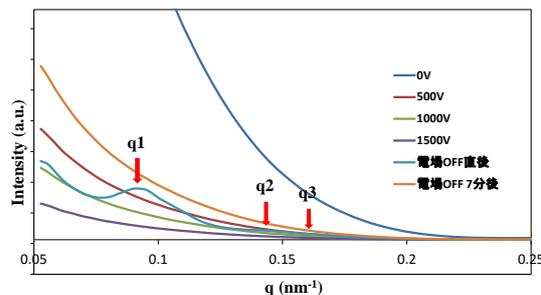


図2. AR4ポリマー結合金ナノロッドのSAXSプロファイルの電場変化

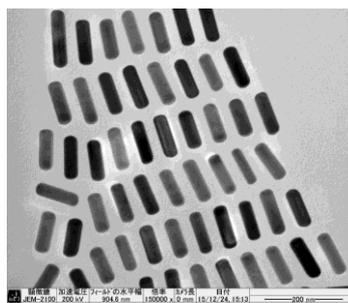


図3. AR4ポリマー結合金ナノロッドのTEM像

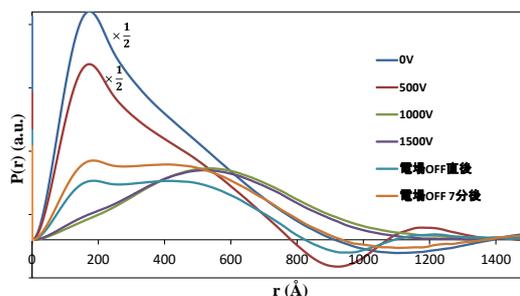


図4. AR6ポリマー結合金ナノロッドのDDFの電場変化

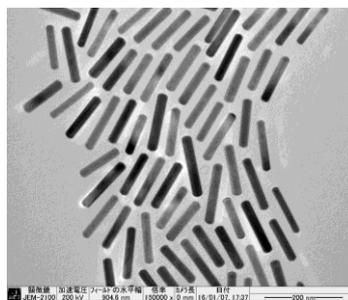


図5. AR6ポリマー結合金ナノロッドのTEM像

## LC/MS を利用した親水性金クラスターの高分解能分離技術の開発

(東理大院総合化学<sup>1</sup>・東理大理<sup>2</sup>) ○島大佑<sup>1</sup>、菊地祥弘<sup>1</sup>、新堀佳紀<sup>1</sup>、根岸雄一<sup>1,2</sup>

## The technical development about high resolution separation of hydrophilic gold clusters studied by LC/MS

(Grad. Sch. of Chem. Sci. and Technol., Tokyo Univ. of Sci.<sup>1</sup>・Fac. of Sci., Tokyo Univ. of Sci.<sup>2</sup>)○Daisuke Shima<sup>1</sup>, Yoshihiro Kikuchi<sup>1</sup>, Yoshiki Niihori<sup>1</sup>, Yuichi Negishi<sup>1,2</sup>

**【緒言】** 粒径が 1 nm 程度のチオラート保護金クラスターは安定であり、発光特性、触媒活性、光学活性といったバルク金では見られない性質を示し、これらの特性はクラスターのサイズに応じて大きく異なることが知られている。こうした理由から、このような金クラスターをそのサイズ毎に精密に合成する技術の確立はクラスター化学の発展において極めて重要であると考えられ、こうした技術の開発が切望されている。しかしながら、チオラート保護金クラスターのほとんどの合成法では様々なサイズの混合物が得られてしまう。こうした問題に対して、私たちは得られた様々なサイズを有する金クラスターの混合物に対して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を駆使することにより、それらを化学組成ごとに精密に分離する技術を開発している。<sup>[1]</sup> 近年、疎水性配位子に保護された金属クラスターについてはそのような高分解能分離技術が発展してきている。一方で、親水性配位子に保護された金属クラスターについては疎水性クラスターの場合に比べ HPLC での分離の報告例が少ない。そこで本研究では親水性クラスターに対し HPLC を用いた新規高分解能分離技術の開発に取り組んだ。更には、クロマトグラフ (LC) と質量分析装置 (MS) を直接接続した LC/MS を新たに分析手法として導入し、分離したクラスターの組成を評価することに取り組んだ。

**【実験方法】** 分離対象とするグルタチオン保護金クラスター ( $\text{Au}_n(\text{SG})_m$ ) は次の二つの方法で調製した。調製方法 1: 塩化金酸のメタノール溶液にグルタチオンを加え、還元剤により還元することにより調製した。<sup>[2]</sup> 調製方法 2: 精密合成したホスフィン保護金 11 量体クラスター ( $\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_2$ ) をクロロホルムに溶解し、グルタチオン水溶液と共に還流した。得られた水溶液側から水溶性クラスターを得た。<sup>[3]</sup> 調製したクラスターは親水性相互作用の違いを利用する親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) により分離した。移動相にはアセトニトリル 48 % と 25 mM 酢酸アンモニウム水溶液 52 % の混合溶媒を用いた。分離の確認は UV クロマトグラム及び質量スペクトルによって評価した。

**【結果と考察】** 調製方法 1 において得られたクラスターのクロマトグラムを図 1(a) に示す。クロマトグラム

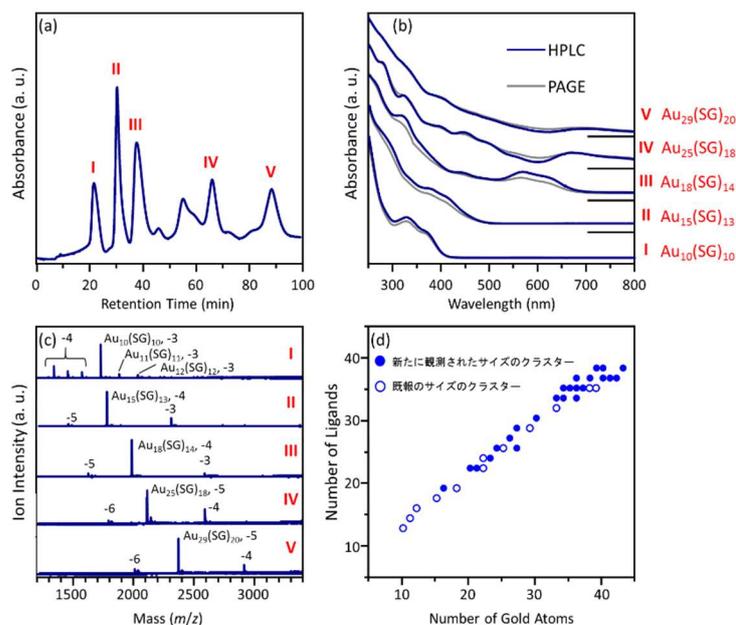


図 1. 調製方法 1 で得られたクラスターの LC/MS による (a) クロマトグラム、(b) 各ピークの紫外可視吸収スペクトル、(c) 各ピークの質量スペクトル、(d) 本手法により観測されたクラスターの組成分布。

中には複数のピーク I~V が観測された。各々のピークの紫外可視吸収スペクトルを図 1(b)に示す。PAGE により分離された代表的なクラスターの文献<sup>[2]</sup>と比較したところ、本手法を用いることでクラスターを高分解能でサイズ毎に分離できることが分かった。また、本研究で得られた吸収スペクトルは、文献よりも明瞭であるため、本手法はより高分解能な分離法であると言える。図 1(c)には LC/MS により得られた各ピークの質量スペクトルを示す。クロマトグラムの代表的なピークにはほぼ単一の組成のクラスターのみが存在していることが確認できる。また、クロマトグラム中の他のピークにおいても、対応する質量スペクトルを得ることに成功しており、様々な化学組成のクラスターを確認することができた。図 1(d)には LC/MS によって観測されたクラスターの組成の分布を示す。本手法によってこれまで観測されたことのないサイズである新規のクラスターを複数観測することができた。このように、HILIC カラム、及び LC/MS を導入することで親水性クラスターをそのサイズ毎に高分解能で分離することを達成し、さらに今まで報告の無い組成のクラスターの評価にも成功した。

続いて、調製方法 2 において得られたクラスターについて記述する。図 2(a)に得られたクラスターのクロマトグラムを示す。クロマトグラム中には比較のため、調製方法 1 で得られたクラスターのクロマトグラム(図 1(a))も示す。複数のピーク群が観測され、これらの保持時間は、 $Au_{18}(SG)_{14}$ と  $Au_{25}(SG)_{18}$ の保持時間と近い値であった。図 2(b)、(c)には LC/MS で得られたクロマトグラム中の各ピーク(I'~III', I''~V'')の質量スペクトルを示す。帰属の結果、これらはクラスター表面のグルタチオンの一部が加水分解によって欠損した SGh<sup>[3]</sup>(図 2(d))となった  $Au_n(SG)_{m-x}(SGh)_x$  に帰属することができた。加水分解された配位子の割合に依存してカラムとの相互作用が弱まり、このような分離が達成されたと考えられる。このことは、本手法は配位子の僅かな違いを分離することができる非常に分解能の高い分離方法であることが示唆される。このことは今後、親水性クラスターにおいて 2 種類の異なる配位子で保護されたクラスターをその組成(配位子の組合せ)毎に分離できる可能性を示唆している。

以上のように、親水性クラスターをそのサイズ毎に高分解能分離することに成功し、LC/MS を導入することで質量スペクトルをオンラインで評価する方法を開発することに成功した。さらには、配位子のわずかな違いを利用してその組成毎に分離することにも成功した。

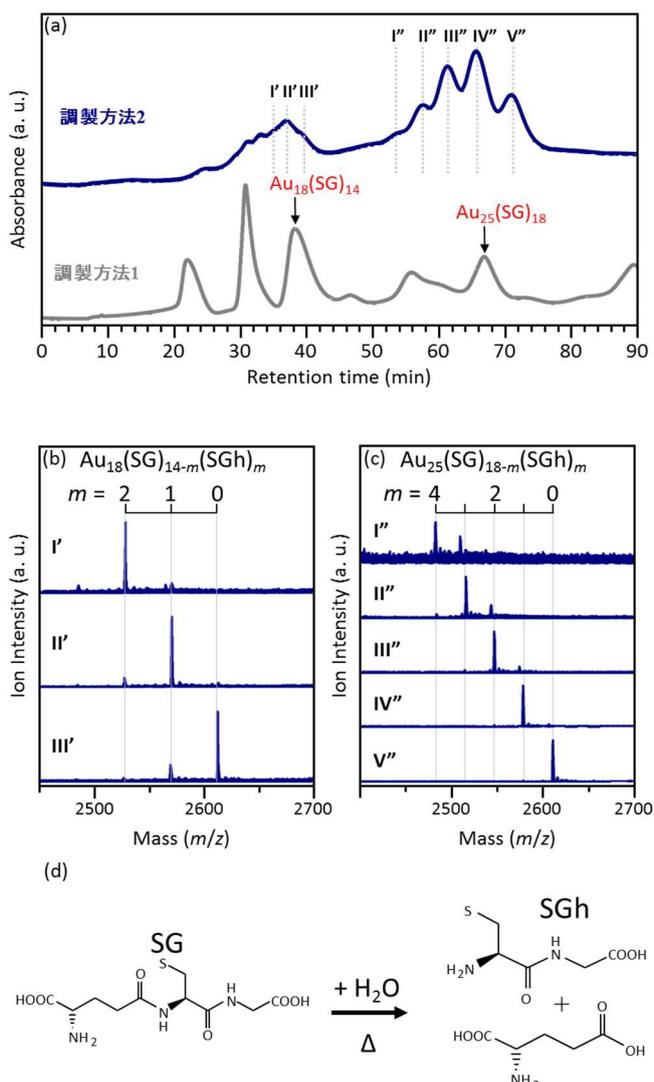


図 2. 調製方法 2 で得られたクラスターの(a) クロマトグラム、(b) ピーク I'~III'質量スペクトル、(c) ピーク I''~V''の質量スペクトル。(d) グルタチオン(SG)の加水分解機構。

[1] Y. Niihori, C. Uchida, W. Kurashige, Y. Negishi, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, 2016, 4251-4265.

[2] Y. Negishi, K. Noubusada, T. Tsukuda, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 2005, 5261-5270.

[3] Y. Shichibu, Y. Negishi, T. Tsukuda, T. Teranishi, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 2005, 13464-13465.

# 新規ロジウム炭化物の戦略的合成

(京大院理<sup>1</sup>, 九大院工<sup>2</sup>, 阪府大院理<sup>3</sup>)

○脇坂拓生<sup>1</sup>, 草田康平<sup>1</sup>, 山本知一<sup>2</sup>, 吉岡聰<sup>2</sup>, 東原登史希<sup>2</sup>,  
松村晶<sup>2</sup>, 久保田佳基<sup>3</sup>, 北川宏<sup>1</sup>

## Strategic Synthesis of Novel Rhodium Carbide

(Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.<sup>1</sup>; Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.<sup>2</sup>;  
Grad. Sch. Sci., Osaka. Pref. Univ.<sup>3</sup>)

○Takuo Wakisaka<sup>1</sup>, Kohei Kusada<sup>1</sup>, Tomokazu Yamamoto<sup>2</sup>, Satoru Yoshioka<sup>2</sup>,  
Toshiki Higashihara<sup>2</sup>, Syo Matsumura<sup>2</sup>, Yoshiki Kubota<sup>3</sup>, Hiroshi Kitagawa<sup>1</sup>

### 【緒言】

元素周期表において 118 種の元素が存在するが、安定で我々が利用可能な元素は 80 種程度である。これまでに、これらの元素を混ぜ合わせることで様々な機能・物性を有する合金材料が創出されている。しかしながら、原子レベルで混合できる元素の組み合わせは限られているため、元素の潜在能力を存分に引き出し、今後更なる材料開発を行うためには任意の元素を自在に混合する技術の確立が必須である。近年、ナノサイズ化することで、バルクでは相分離する元素対からなる固溶合金が作製され、ナノ物質における材料開発の可能性が広がっている<sup>[1]</sup>。しかし、その多くは *d*-ブロック元素の遷移金属元素の組み合わせであり、更なる材料開発のためには *s* または *p*-ブロック元素の典型元素も視野に入れた合成手法の開発が必要である。特に触媒として有用な白金族元素(*d*-ブロック元素)と地球上で最も豊富な元素である窒素や炭素等の軽元素(*p*-ブロック元素)の組み合わせはこれまで十分に研究されていない。この組み合わせはバルクでは安定な合金を形成しにくく、実験的に報告されている例は極めて稀であり、且つそれらは高温合成、高压合成でのみ達成されている<sup>[2][3]</sup>。本研究では液相合成法を用いてナノサイズ化することで、バルクでは存在しない組み合わせである白金族元素のロジウムと軽元素の炭素から成る新規化合物を作製し、その構造および電子状態を調べることを目的とした。

### 【実験】

ロジウム前駆体、炭素源、保護剤を溶媒中で

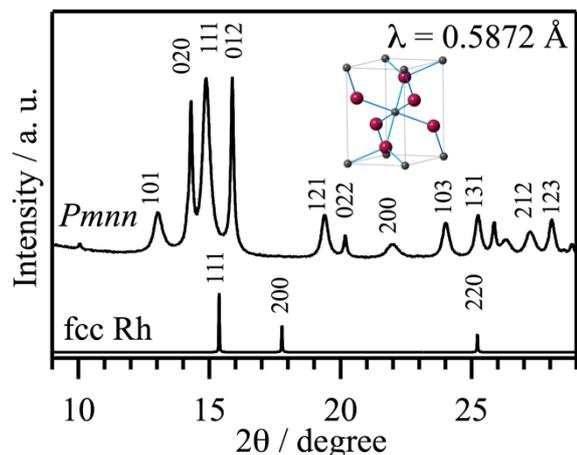


図1 新規 Rh 炭化物の粉末 X 線回折パターンと結晶構造

加熱し、還元速度と炭素の供給を制御することで目的物を得た。通常のロジウムナノ粒子の液相合成法と大きく異なる点は特殊な炭素源を用いたことである。また、高温、高压で合成した他の貴金属炭化物、窒化物の報告例とは異なり、常圧、200 °Cの温和な条件下で合成を行った。得られた化合物は、粉末 X 線回折 (PXRD) 測定、走査透過型電子顕微鏡 (STEM) 観察、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) を用いて構造を同定し、X 線吸収微細構造 (XAFS) 測定により電子状態を観察した。

### 【結果】

PXRD パターンはロジウムナノ粒子が示す面心立方格子のパターンとは異なっており、既存のロジウム化合物とも異なる構造を持つ新規物質が得られたことが確認できた。Rietveld 法により構造最適化した結果、合成した化合物は空間群  $Pmnn$  の新規のロジウム炭化物であることが示唆された (図 1)。得られたロジウム炭化物の構造は、ロジウム原子の面が ABAB と積層した hcp 構造のように配置しており、fcc 構造の金属ロジウムとは大きく異なることが分かった。また、TEM 観察より、10 nm 程度の粒子が凝集した粒子が観測され、STEM-EDX 分析の結果から粒子全体に炭素原子とロジウム原子が均一に分布していることが分かり、得られた物質がロジウム炭化物であることが確認できた (図 2)。高分解能 STEM 観察で構造を確認したところ、ロジウム原子の配列は PXRD 解析から得られたモデル構造と良く一致した (図 3)。さらに、XAFS 測定から、ロジウム炭化物は通常の金属ロジウムと異なる電子状態を有することが明らかとなった。

[1] K. Kusada and H. Kitagawa, *Adv. Mater.* **28**, 1129 (2016)

[2] E. Gregoryanz *et al.*, *Nat. Mater.* **3**, 294 (2004)

[3] NRS. Kumar *et al.*, *J. Phys. Condens. Matter* **24**, 362202 (2012)

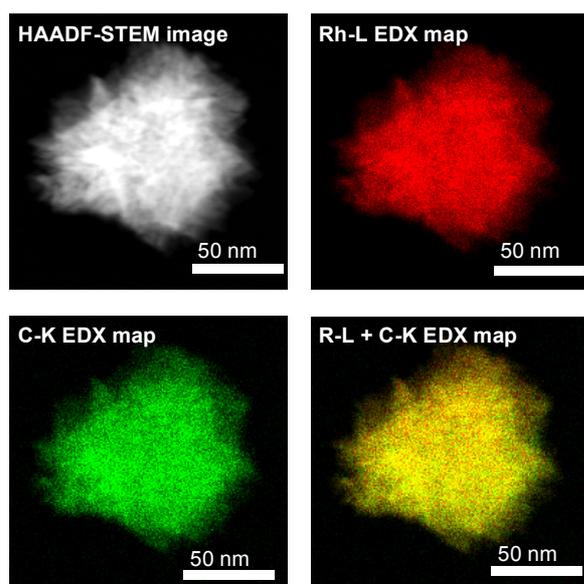


図 2 Rh 炭化物の HAADF-STEM 像および EDX 元素マップ

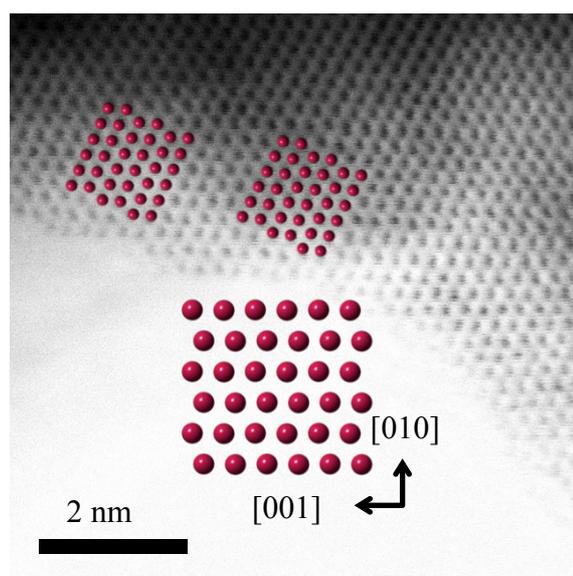


図 3 Rh 炭化物の高分解能 STEM 像と Rietveld 解析より得られた構造モデル

2P084

## アルキニル保護イリジウムクラスターのサイズ選択的合成と構造評価

(東大院理<sup>1</sup>, 京大 ESICB<sup>2</sup>, JST CREST<sup>3</sup>)

○山本博輝<sup>1</sup>, 高畑遼<sup>1</sup>, 山添誠司<sup>1,2,3</sup>, 佃達哉<sup>1,2</sup>

### Size-selective synthesis and structure characterization of alkynyl-protected iridium clusters

(UTokyo<sup>1</sup>, Kyoto Univ. ESICB<sup>2</sup>, JST CREST<sup>3</sup>)

○Hiroki Yamamoto<sup>1</sup>, Ryo Takahata<sup>1</sup>, Seiji Yamazoe<sup>1,2,3</sup>, Tatsuya Tsukuda<sup>1,2</sup>

【序】 2011年にはじめてアルキニル (RC≡C-) 保護金クラスターの合成が報告[1]されて以来、その構造や物性が活発に研究されている。最近の単結晶 X 線構造解析[2,3]によって、アルキニル配位子が Au-C 結合を介して直接金コアに結合した構造や、金アルキニルオリゴマー RC≡C-Au-C≡CR が π 結合を介して金コアに結合した構造など、多様な界面構造を形成することが明らかにされた。特に直立型の結合様式ではアルキニル配位子の π 電子系と金コアの電子準位のカップリングが報告されており、機能化の観点からも興味深い[2]。しかし、アルキニル保護金属クラスターの合成例は、これまで金と銀に限られており[1-3]、アルキニルによる保護が可能な金属元素の範囲や、金属元素ごとの界面構造などは明らかにされていない。本研究ではこれらを解明することを目指して、フェニルアセチレン (PA) で保護されたイリジウムクラスター (Ir:PA) を例として取り挙げ、そのサイズ選択合成と構造評価に取り組んだ。

【実験】 まず、ヘキサクロロイリジウム (IV) 酸カリウムを、塩基性のエチレングリコールに溶解させ、アルゴン雰囲気下 160 °C で 1 時間加熱することで、イリジウムクラスターを調製した[4]。次に、これに PA のクロロホルム溶液を加え、60 °C で 3.5 時間攪拌混合することで、配位子交換反応により Ir:PA クラスターを合成した。Ir:PA の組成および構造を、透過電子顕微鏡 (TEM) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) 法、X 線光電子分光 (XPS) 法、X 線吸収微細構造 (XAFS)、及び赤外分光 (FT-IR) 法によって評価した。

【結果と考察】 合成した Ir:PA クラスターの MALDI 質量スペクトルを図 1 に示す。質量数 12100 Da 付近に鋭いピークが観察されたことから、単分散の Ir クラスターが得られたことがわかった。これまでに単離・同定されている Au:PA クラスター[1]と同程度の金属—配位子の組成比を仮定すると、Ir<sub>50</sub>PA<sub>24</sub> (12037 Da) や Ir<sub>51</sub>PA<sub>23</sub> (12129 Da) などが有力な候補として挙げられる。図 2 に、Ir:PA クラスターの TEM 像と粒径分布を

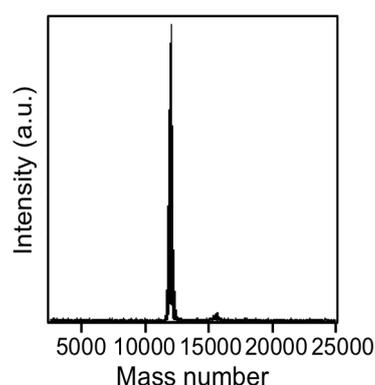


図 1. 合成した Ir:PA の MALDI 質量スペクトル。

示す。平均粒径は  $1.3 \pm 0.2$  nm であり、50 量体程度の単分散クラスターが得られたことを支持している。また Ir L<sub>3</sub> 殻 EXAFS 解析により求められた Ir-Ir の平均配位数 ( $7.3 \pm 0.9$ ) も、Ir:PA クラスターのサイズが 50 量体程度であることと矛盾しない。

図 3 に、KBr 法で測定した PA と Ir:PA クラスターの FT-IR スペクトルを示す。まず、PA で  $3290 \text{ cm}^{-1}$  に見られた  $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$  伸縮振動のピークが Ir:PA クラスターでは消失していることから、PA の水素が解離して直接 Ir-C 結合が形成されていることが分かった。また、PA の  $\text{C}\equiv\text{C}$  伸縮振動のピーク並びにベンゼン環の C-H 伸縮振動のピークが、配位によって長波長シフトしていることから、金-アルキニル間と同様[2]、Ir:PA においてもクラスターと配位子の末端アルキニル部位の間で電子的な共役が起きていることが示唆された。さらに、Ir L<sub>3</sub> 殻 EXAFS 解析で得られた Ir-C 結合の平均配位数は  $1.1 \pm 0.7$  であり、 $\text{Au}_{54}\text{PA}_{26}$  の Au-C 結合の平均配位数 ( $1.3 \pm 0.5$ ) と同程度であった[5]。このことは、PA はイリジウムクラスターに対しても金クラスターと同様の配位構造をとることを示唆している。

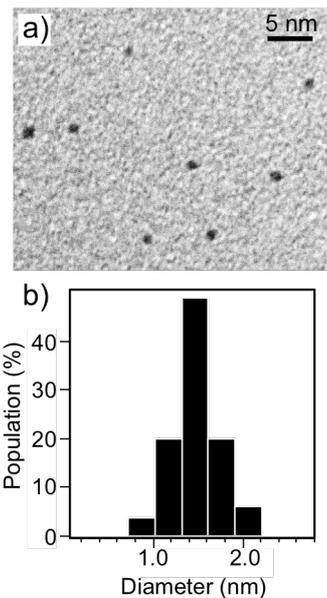


図 2. Ir:PA の a) TEM 像と b) 粒径分布。

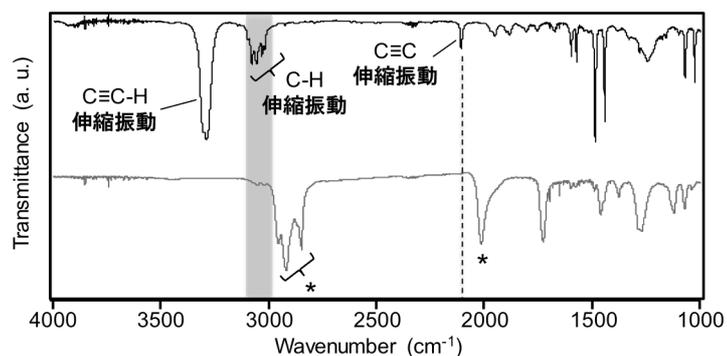


図 3. Ir:PA の IR スペクトル. \*は赤方偏移後の C-H 伸縮振動及び  $\text{C}\equiv\text{C}$  伸縮振動のピーク。

- [1] P. Maity, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20123. [2] N. Kobayashi, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16078. [3] Y. Wang, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3278. [4] Y. Wang, *et al.*, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1622. [5] P. Maity, *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9450.

## 2P085

### デンドリマーを鋳型とした典型元素サブナノ粒子の精密合成

(東工大化生研) ○渡邊 藍子, 神戸 徹也, 今岡 享稔, 山元 公寿

#### Precise Synthesis of Sub-nano-sized Typical Metal Particles using a Dendrimer Template (Laboratory for Chemistry and Life Science, Tokyo Institute of Technology)

○Aiko Watanabe, Tetsuya Kambe, Takane Imaoka, Kimihisa Yamamoto

【序】数個の原子から構成されるサブナノ粒子は、バルクやナノ粒子とは異なる性質を持つと期待されている。しかし、こうしたサブナノ粒子は原子数を制御した合成が困難であり、十分な研究がされていない。

我々の開発したフェニルアゾメチンデンドリマー (Figure 1, DPAG4)は、分子内ポテンシャル勾配を持ち、内層から段階的に金属と錯形成することが可能である<sup>1</sup>。我々はこの精密金属集積能を利用し、個数を精密に制御した金属サブナノ粒子の合成を達成している<sup>2</sup>。これまで、遷移金属元素について研究を展開してきたが、典型金属元素については未開拓であった。本研究では、典型元素種の鋳型デンドリマーへの精密集積および鋳型還元に基づく精密クラスター構築を開拓した (Figure 2)。さらに本手法による超原子構築も検討したので報告する。

【実験】本研究では典型元素として  $\text{GaCl}_3$ ,  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{BiCl}_3$  を用いた。DPA 溶液にこれら金属溶液を滴定し、UV-vis 測定により錯形成挙動を確認した。

DPAG4 溶液に対し、目的のクラスターの構成原子数に対応するモル当量の金属塩溶液を加え錯形成を行った。その後、 $\text{NaBH}_4$  メタノール溶液を加え還元することで、構成個数を厳密に制御した典型金属クラスターを合成した (Figure 3)。

合成した各種クラスターに対し、STEM, XPS, ESI-TOF-MS 測定を行うことで、目的とするクラスター構築の確認と、その構造解明を行った。

【結果と考察】UV-vis 測定による滴定実験から、DPAG4 に対し  $\text{BiCl}_3$  が 1:1 で段階的に錯形成できることを新たに見出した。UV-vis スペクトルの錯体由来の吸光度の変化を、理論曲線とのカーブフィッティングを行うことで、 $\text{BiCl}_3$  の錯形成定

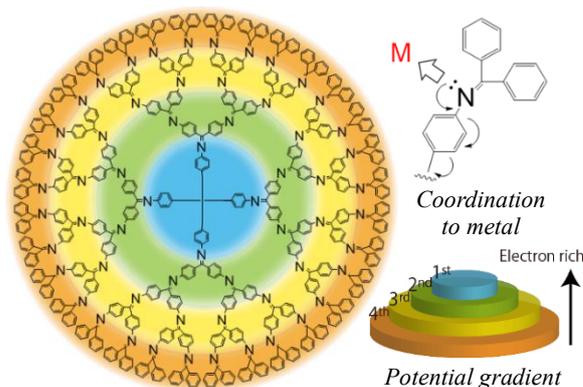


Figure 1. Phenylazomethine dendrimer.

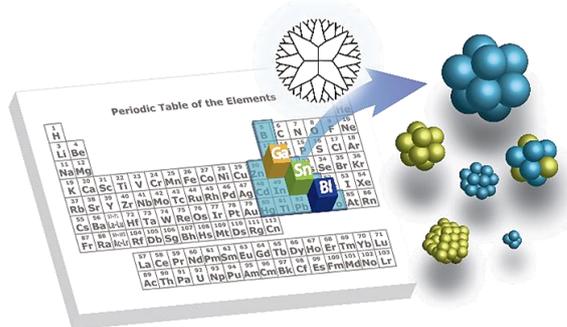


Figure 2. Subnano-sized particles consisting of typical elements.

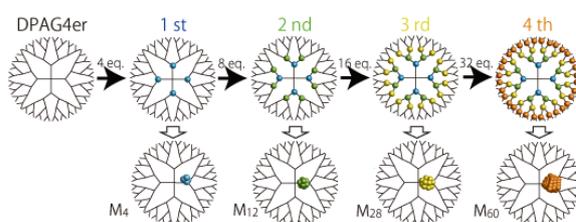


Figure 3. Synthesis process of precisely size-controlled metal clusters.

数を  $3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  と算出した。GaCl<sub>3</sub> や SnCl<sub>2</sub> と比較することで、錯形成の強さは GaCl<sub>3</sub> > BiCl<sub>3</sub>  $\approx$  SnCl<sub>2</sub> であることが分かり、電子密度勾配を利用した混合集積が可能であることを見出した (Figure 4)。これら結果を踏まえて、GaCl<sub>3</sub> と BiCl<sub>3</sub> の異種金属混合錯形成を行なったところ、錯形成能の強い Ga が内側、弱い Bi が外側になるようにして精密集積され、 dendrimer を用いた典型金属の精密集積を達成した。

この精密集積を利用して、個数規定クラスターの合成を行った。DPAG4 に対して BiCl<sub>3</sub> をそれぞれ 12 当量、28 当量、60 当量と各層まで段階的錯形成させたのち、NaBH<sub>4</sub> により還元することで、Bi<sub>12</sub>、Bi<sub>28</sub>、Bi<sub>60</sub> クラスタを合成した。STEM によるクラスターの観察から、構成原子数の増加とともに粒径の増大を確認した。いずれのクラスターも粒径分布が狭いことから、DPA を鋳型として用いることで Bi クラスタが画一的に合成されたことを確認した (Figure 5)。さらに、高分解能 STEM 測定により、Bi<sub>12</sub> の原子分解能の観察を行った。Bi<sub>12</sub> が電子線により崩壊する様子から、原子が精密に 12 個集まってクラスターを構成していることを実証した (Figure 6)。

同様の手法を用い新規 Ga クラスタ、さらには Ga と Bi を精密に配合した異種金属クラスター構築も達成した。DPA の 1 層目に GaCl<sub>3</sub>、2 層目に BiCl<sub>3</sub> を錯形成させ還元することで Ga<sub>4</sub>Bi<sub>8</sub> クラスタを合成した。STEM 観察により、構成個数と組成の制御を確認した (Figure 7)。また、一原子付加型 dendrimer を利用することで Ga<sub>13</sub><sup>-</sup> の構築を達成し、ESI-TOF-MS 測定により、その構造をとらえた。Ga<sub>13</sub><sup>-</sup> はジェリウムモデルで (1S)<sup>2</sup>(1P)<sup>6</sup>(1D)<sup>10</sup>(2S)<sup>2</sup>(1F)<sup>14</sup>(2P)<sup>6</sup> の閉殻構造を持つ安定超原子であり、本研究で用いた手法により、液相で超原子を構築できることを見出した。

#### 【参考文献】

- [1] K. Yamamoto, M. Higuchi, S. Shiki, M. Tsuruta, H. Chiba, *Nature* **2002**, *415*, 509.  
 [2] K. Yamamoto, T. Imaoka, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1127.

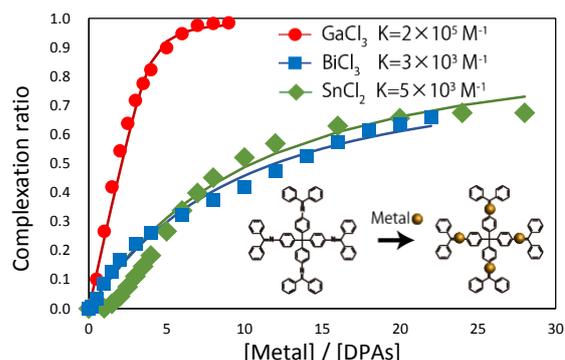


Figure 4. The titration curves obtained from the experiments monitored at 410 nm and calculated values of GaCl<sub>3</sub> (circles), BiCl<sub>3</sub> (squares) and SnCl<sub>2</sub> (diamonds).

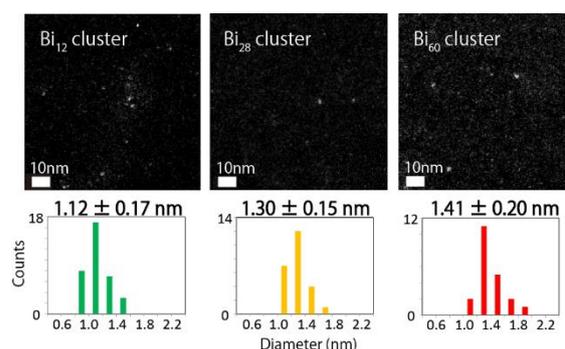


Figure 5. STEM images and dispersions of Bi<sub>12</sub>, Bi<sub>28</sub> and Bi<sub>60</sub> clusters.

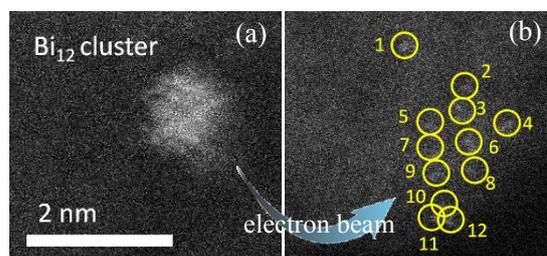


Figure 6. High resolution STEM images of Bi<sub>12</sub> clusters (a) before and (b) after decomposition by electron beam. Yellow circles focus on Bi atoms.

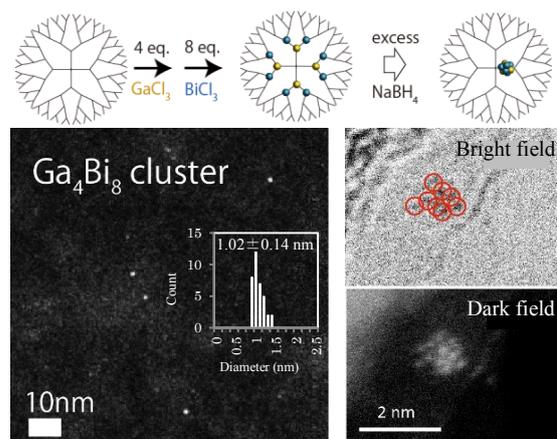


Figure 7. STEM images of Ga<sub>4</sub>Bi<sub>8</sub> clusters.

## 2P086

### CdSe/CdS コア-シェル量子ドットの合成とフェムト秒状態選択励起による 励起子ダイナミクスの研究

(関学大院・理工) ○野中康平, 奥畑智貴, 片山哲郎, 王莉, 玉井尚登

#### Femtosecond State Selective Excitation Spectroscopy on Exciton Dynamics and Carrier Transfer in CdSe/CdS Core-Shell Quantum Dots (Kwansei Gakuin Univ.)

○Kohei Nonaka, Tomoki Okuhata, Tetsuro Katayama, Li Wang, Naoto Tamai

【序】電子と正孔をボーア半径以下に閉じ込めた半導体量子ドット(QDs)では、閉じ込め効果によって原子のように離散的なエネルギー準位を持つことが知られている。QDs は吸収断面積が大きいこと、耐光性が高く、吸収、発光波長を粒子サイズによって制御出来ることなどから、生体標識や太陽電池、レーザーなどへの応用が期待されている。

半導体量子ドットを光励起すると電子と正孔が生成し、様々な緩和過程を経て消滅するが、その中には QDs 表面の欠陥に由来する無輻射遷移などの発光現象を阻害する過程も含まれる。このような過程は QDs の表面状態に強く依存していると考えられており、近年では合成法の進展とともに、複数の無機化合物を用いて QDs の組成や表面構造を変化させ、光物性を制御する研究が盛んに行われている。その光物性を制御する方法の一つとして、QDs(コア)を別の化合物(シェル)で覆ったコア-シェル型 QDs がある。コア-シェル型 QDs には、電子と正孔をコアに閉じ込める Type I と電子と正孔のどちらかをコアに、もう一方をシェルに閉じ込める Type II がある。シェルで覆うことにより、表面欠陥へのトラップが抑制され、発光量子収率や安定性の向上が期待されるだけでなく、QDs 内の電子と正孔の空間分布を制御することもできる。

コア-シェル型 QDs 系のキャリア移動は、シェルの厚みに強く依存すると考えられるが、励起波長やシェル厚み依存性の詳細な解析はあまりない。本実験ではコロイド合成法を用いてコアに CdSe, シェルに CdS を用いたコア-シェル QDs の合成を行い、吸収、発光スペクトル、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて構造解析を行った。また時間分解発光スペクトルや過渡吸収スペクトルの測定を行い、コア-シェル型 QDs 系のキャリア素過程の解析を行った。

【実験】Cd 前駆体に Se 前駆体を反応させることで CdSe QDs を合成し[1], SILAR 法によってそれぞれの CdSe QDs 溶液に Cd 前駆体と S

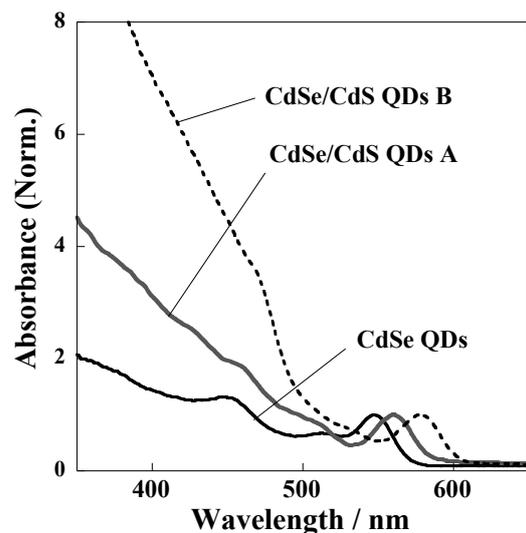


Fig. 1 CdSe QDs と CdSe/CdS コア/シェル型 QDs の吸収スペクトル

前駆体を交互に加えて加熱攪拌を行うことで CdSe QDs 表面に CdS のシェルを積層させ、CdSe/CdS コアシェル QDs の合成を行った[2]。吸収、発光スペクトル、電子顕微鏡 (TEM) 等を用いて QDs の構造解析を行い、過渡吸収分光や発光寿命測定によりその励起子ダイナミクスを明らかにした。

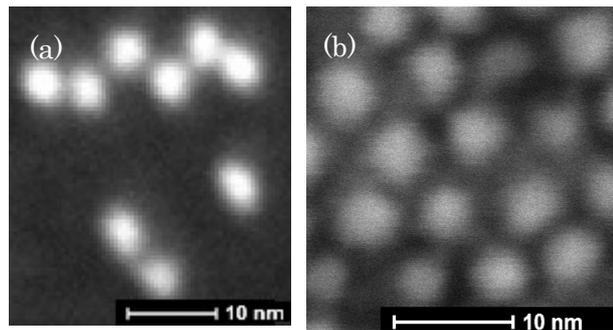


Fig.2 (a) CdSe QDs と (b) CdSe/CdS QDs A の走査型透過電子顕微鏡 (STEM)

【結果と考察】合成した コア-シェル型 QDs の吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

吸収スペクトルは、Cd と S の前駆体を加えた回数とともに長波長シフトが見られた。これは前駆体の添加回数の増加に伴ってシェルの厚みが増加していき、コアの電子-正孔の波動関数がシェルに染み出した事による。吸収・発光スペクトルの結果から見積もられた発光の量子収率は CdSe QDs の約 15% から CdS シェルで覆うことで約 2 倍近くの増加が見られた。また STEM (Fig. 2) を用いて形状とサイズの確認を行うと、CdSe QDs のサイズが約 3 nm で、CdSe/CdS QDs A のサイズが約 4 nm でありほぼ球形であることから CdS のシェルが積層されていることを確認できた。

CdSe/CdS QDs B の過渡吸収スペクトルを Fig. 3 に示す。コアの 570 nm とシェルの 400 nm 励起を行い、572 nm と 475 nm にコア領域とシェル領域のブリーチピークが観測された。励起波長が異なると、シェルの厚みが増加するにつれて、コアとシェルのブリーチの比が異なる事がわかった。これは、CdTe/CdS QDs の結果と類似しており[3]、コア-シェル界面に粒界が生成することによるポテンシャルバリアの存在によると考えられる。また、コアの 1S 励起の過渡吸収ダイナミクスにおいて、シェルの 475 nm のダイナミクスに  $\sim 40$  fs のライズ成分が観測され、コアのダイナミクスはそれに対応する減衰が観測された (Fig. 4)。これはコア領域からシェル領域へキャリアが  $\sim 40$  fs で移っている事を示している。

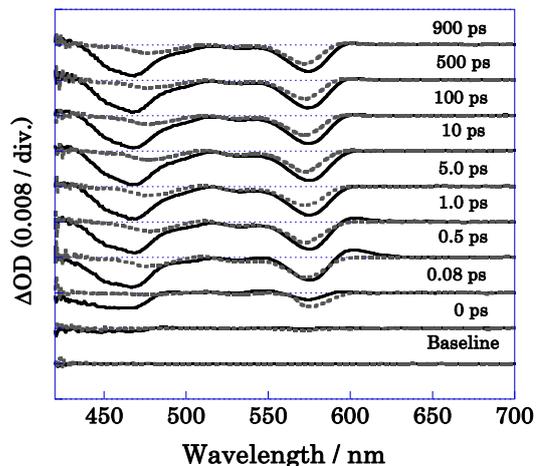


Fig. 3 CdSe/CdS QDs B の過渡吸収スペクトル (実線:  $\lambda_{ex} \sim 400$  nm, 点線:  $\lambda_{ex} \sim 570$  nm)

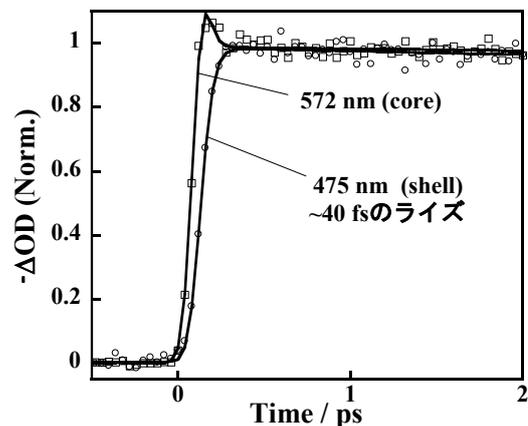


Fig. 4 CdSe/CdS QDs B の過渡吸収ダイナミクス ( $\lambda_{ex} \sim 570$  nm)

[1] J. N. Freitas et al., *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 4845-4853.

[2] J. Zhang, X. Zhang, J. Y. Zhang, *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 3904-3908.

[3] L. Wang, Y. Tian, T. Okuhata, N. Tamai, *J. Phys. Chem. C* **2015**, 119, 17971-17978.

2P087

## 量子井戸型CdSeナノプレートレットの電場効果

(関西学院大・理工<sup>1</sup>, 台湾国立交通大<sup>2</sup>) 奥畑 智貴<sup>1</sup>, Kamlesh Awasthi<sup>2</sup>, 太田 信廣<sup>2</sup>,  
○玉井 尚登<sup>1</sup>

### Electric Field Effects on Photophysical Properties of CdSe Nanoplatelets with Quantum-well Structure

(Kwansei Gakuin Univ.<sup>1</sup>, National Chiao Tung Univ. (Taiwan)<sup>2</sup>)

Tomoki Okuhata<sup>1</sup>, Kamlesh Awasthi<sup>2</sup>, Nobuhiro Ohta<sup>2</sup>, ○Naoto Tamai<sup>1</sup>

【序】半導体ナノ粒子は、コロイド合成によってその形状や粒径を自在に変える事が可能であり、単一励起子による発光特性の制御だけでなく、多励起子の関与するキャリア増幅やオージェ再結合、ホットキャリア移動などバルクとは異なった光特性を示すことが知られている。特に CdSe に関しては、3次元量子閉じ込めの量子ドット (QDs)、2次元量子閉じ込めのナノロッド (NRs) だけでなく、量子井戸構造に対応する1次元量子閉じ込めのナノプレートレット (NPLs) などもコロイド合成出来るようになってきた。この様な半導体ナノ粒子の量子閉じ込めと電子構造および多励起子緩和過程やキャリア移動等の関係を明らかにする事は、光電変換素子などへの応用において極めて重要である。

一方、分子や分子集合体の吸収や発光に及ぼす外部電場効果は、電子構造や励起状態の緩和・反応機構を解析する上で重要な手法であり、フラーレンやポルフィリン、その連結化合物などの機能性分子だけでなく、半導体ナノ粒子 CdX QDs (X = S, Se, Te) および PbX QDs (X = S, Se) に対しても研究が行われてきた<sup>1-4</sup>)。その結果、1S 励起子の生成に伴う双極子モーメントの増加や発光の電場消光だけでなく、PbX QDs では禁制バンドの存在とその電場応答が明らかになった<sup>3,4</sup>)。CdSe NPLs の吸収に及ぼす電場効果に関しても、QDs に比べて10倍程度大きな効果を有する事が最近報告されたが、双極子モーメント ( $\mu$ ) や分極率 ( $\alpha$ ) の変化は解析されていない<sup>5</sup>)。本研究では、CdSe NPLs の電場吸収・電場発光と発光寿命の電場効果を定量的に解析し、励起子生成に伴う  $\Delta\mu$ ,  $\Delta\alpha$  と隠れたバンドの存在を明らかにした。

【実験】オレイン酸を保護剤とした4層のCdSe NPLs をコロイド合成し、走査型透過電子顕微鏡 (STEM) を用いて構造解析した。試料は、PMMA トルエン溶液を用い、ITO 石英基板上に薄膜を作製した。更に半透明 Al を PMMA 薄膜上に蒸着し、ITO-Al 間に交流電場を印加した。吸収、発光スペクトルの電場同期成分を検出した。発光寿命の電場効果は、Ti:Sapphire laser の第二高調波 ( $\lambda_{ex} = 400$  nm) を励起光に用い、電場の ON/OFF に伴う寿命変化を single photon timing 法で交互に積算して求めた。

【結果・考察】図1に合成したCdSe NPLs の溶液中の吸収・発光スペクトルと STEM

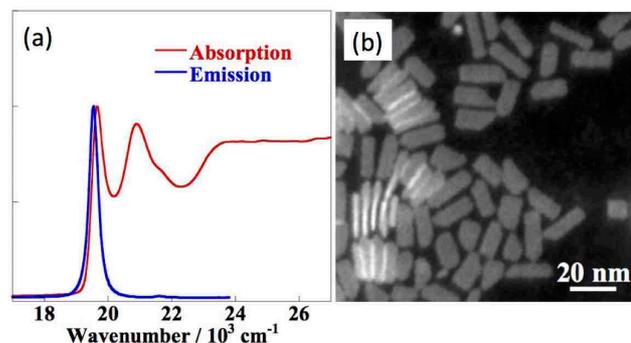


Fig. 1 (a) Absorption and emission spectra of CdSe NPLs in toluene solution, (b) STEM image of CdSe NPLs.

像を示す。heavy-hole (509 nm), light hole (479 nm) バンドおよび STEM から、試料は厚み~1.2 nm, サイズ  $17 \times 6.3 \text{ nm}^2$  の4層の CdSe NPLs である。発光寿命は多指数関数的な振る舞いを示し、平均寿命は約 2.9 ns であった。

CdSe NPLs の電場吸収変化  $\Delta A(\nu)$  は、PMMA 薄膜中の heavy-hole band 近傍の  $19570 \text{ cm}^{-1}$  に負ピークを持ち、電場強度 ( $F^2$ ) に対し、 $0.02 \text{ MV}^2 \text{ cm}^{-2}$  程度の低い値から非線形性を示した。電場発光変化も、同程度の電場強度から非線形性を示した。吸収変化量は  $0.02 \text{ MV}^2 \text{ cm}^{-2}$  で 5~6% にも及び、CdSe NPLs が QDs に比べて非常に大きな電場効果を持つことを示している。 $\Delta A(\nu)$  は、吸収スペクトルの 0 次, 1 次, 2 次微分の和として表され、その解析から励起状態生成に伴う  $\Delta\mu$ ,  $\Delta\alpha$  を求めることが出来る。CdSe NPLs/PMMA のスペクトルを heavy-hole (G-1), light-hole (G-3), 中間 (G-2), split off (G-4) バンドに分け、線形領域の電場強度 ( $F = 0.1 \text{ MVcm}^{-1}$ ) で測定した電場吸収スペクトルを simulation した (図 2)。G-2 を考慮しない場合, simulation は実験データを再現できない (図 2b) が、G-2 を考慮することにより再現性よくスペクトルを simulation 出来る事がわかった。中間 G-2 は、heavy-hole や light-hole に比べて強度が弱く、いわば隠れたバンドである。また、heavy-hole と light-hole の吸収に伴う  $\Delta\mu$  は、各々 38 D, 33 D であり、 $\Delta\alpha$  は、 $1.1 \times 10^4 \text{ \AA}^3$ ,  $7.1 \times 10^3 \text{ \AA}^3$  と求まった。一方、G-2 は、 $\Delta\mu \approx 0$  であり  $\Delta\alpha$  は G-1, G-3 と符号が異なるだけでなく非常に大きな値 ( $\Delta\alpha \approx -3.6 \times 10^4 \text{ \AA}^3$ ) を持つ。G-2 のこの振る舞いは、PbSe QDs で観測された禁制バンドの振る舞い<sup>3)</sup> ( $\Delta\mu \approx 0$ ,  $\Delta\alpha$  は負) とよく似ており、CdSe NPLs の電子状態を考える上で重要である。

電場発光は、電場による消光過程が観測された。また発光寿命は、電場によって平均寿命が僅かに短くなると共に、初期強度が減少することが分かった。この事は、電場によって励起子が発光状態に緩和するまでに電荷分離することを示唆している。

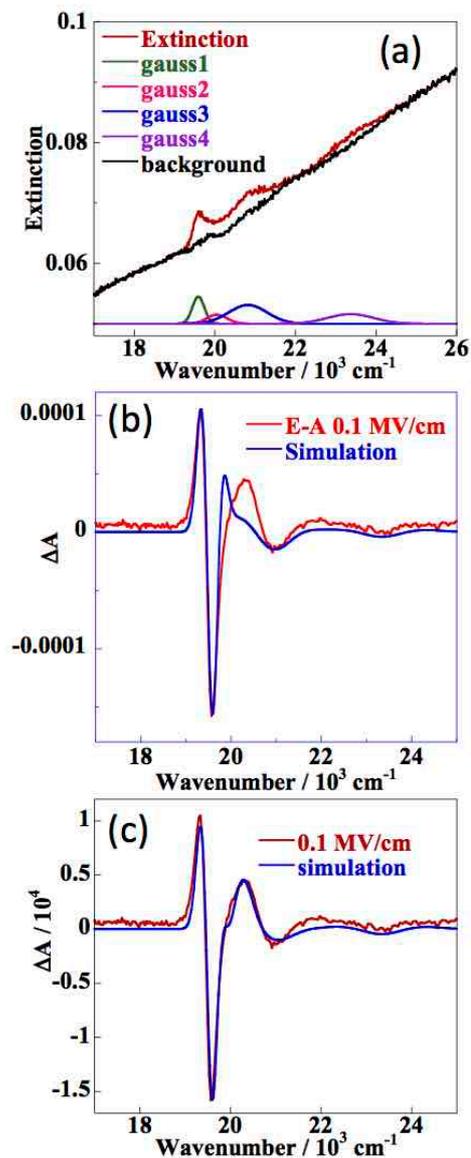


Fig. 2 (a) Absorption spectrum of CdSe NPLs in PMMA thin film and the fitting with four Gaussian spectra (G-1 ~ G-4), (b) E-A spectrum and its simulation with G-1, G-3, and G-4, (c) E-A spectrum simulated with all Gaussian spectra (G-1 ~ G4).

- [1] M. S. Mehata, M. Majumder, B. Mallik, N. Ohta, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 15594.
- [2] R. Ohshima, T. Nakabayashi, Y. Kobayashi, N. Tamai, N. Ohta, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 15274.
- [3] K. Awasthi, T. Iimori, and N. Ohta, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 18170.
- [4] K. Awasthi, T. Iimori, and N. Ohta, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 4351.
- [5] A. W. Achtstein *et al.*, *ACS Nano* **2014**, *8*, 7678.

## SiC 上グラフェンのチップ増強ラマン分光による解析

(関西学院大院 理工<sup>1</sup> 東京大学 生研<sup>2</sup>) 上村奨平<sup>1</sup>、久津間保徳<sup>1</sup>、Sanpon Vantasin<sup>1</sup>、田中嘉人<sup>2</sup>、北濱康孝<sup>1</sup>、日比野浩樹<sup>1</sup>、金子忠昭<sup>1</sup>、尾崎幸洋<sup>1</sup>

Analysis of graphene grown on SiC by tip enhanced Raman spectroscopy (Kwansei Gakuin univ<sup>1</sup> Tokyo Univ<sup>2</sup>) Shohei Uemura<sup>1</sup>, Yasunori Kutsuma<sup>1</sup>, Sanpon Vantasin<sup>1</sup>, Yoshito Tanaka<sup>2</sup>, Yasutaka Kitahama<sup>1</sup>, Hiroki Hibino<sup>1</sup>, Tadaaki Kaneko<sup>1</sup>, Yukihiro Ozaki<sup>1</sup>

【序】二次元結晶であるグラフェンは、電子・化学・機械的に高い特性を有する機能性材料であることから近年非常に注目を浴びている。グラフェンの結晶性を評価するために、ラマン分光スペクトルの解析が広く用いられてきた。これまで我々は、高品質かつ大面積グラフェンウエハーの生成が期待されている SiC 熱分解法を用いた C 面上のグラフェンに対して、ナノメートルスケールでの高空間分解能を有するチップ増強ラマン散乱 (TERS) を含むラマン分光を用いて、品質評価を行ってきた。その結果、グラフェン表面に存在するナノ構造が及ぼす影響、ナノ構造の形成過程や品質評価の基準などについて明らかにしてきた<sup>1)</sup>。しかしながら、デバイス応用を考える上で C 面に比べて層数や形状の制御が容易な Si 面について、C 面と同様に TERS を含むラマン分光法を用いた測定・解析による評価を行う必要がある。しかしながら、通常 Si 面上に作成した場合、下地の基板と局所的に不安定な積層構造 (以後バッファ一層) が周期的に発現することが知られている (図 1)<sup>2)</sup>。そこで、本研究では TERS を含むラマン分光法を用いてバッファ一層を伴ったサンプル及び除去した後のサンプルの測定・解析を行い評価した。

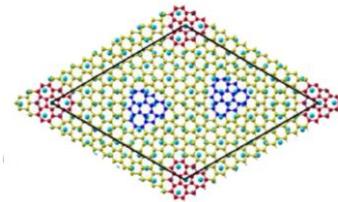


図 1 バッファ一層がある場合に形成する  $6\sqrt{3} \times 6\sqrt{3}$  構造

【実験】 Si 蒸気圧エッチングした SiC (0001) Si 面に対して、Si 分圧を閉じ込めグラフェン核形成及び成長をコントロールすることにより、バッファ一層を伴ったグラフェン及び水素インターカレーションを行うことによりバッファ一層を取り除いたリボン状のグラフェンを作製した。



図 2 In-lens 検出器によるグラフェンナノリボンの SEM 観察像

また、In-lens 検出器による SEM 観察及び AFM 観察によってグラフェン表面を観察

した (図 2)。ラマンマッピングは励起波長 514 nm、測定範囲 10  $\mu\text{m}$ ×10  $\mu\text{m}$ 、空間分解能 450nm で行った。TERS 測定には銀バルク探針 (先端曲率半径 50nm 以下) を用い、励起波長 514 nm で行った。

【結果・考察】通常のラマン測定の結果より、バッファ層を伴うグラフェンでは、グラフェンのピークは観測できなかった。しかしながら、バッファ層を取り除いた後ではグラフェン特有のピークが観測された。この結果から、バッファ層がラマンスペクトルに影響を及ぼすことが示唆された。通常のラマン分光では空間分解能が 450 nm であるので、より空間分解能の小さい TERS 測定を行うことによりナノスケールでの測定及び解析を行った結果、

ラマン測定と同様にバッファ層を伴うとグラフェンのスペクトルは得られず、バッファ層を除去したものはグラフェンのピークが観測された (図 3)。これらラマン測定及び TERS 測定の結果から、バッファ層の影響は空間分解能に依存せず、ラマン測定による結晶性の評価には

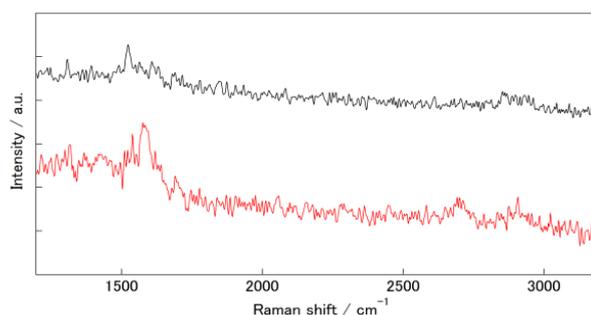


図 3 バッファ層あり (上) とバッファ層なし (下) でのグラフェンナノリボンの TERS スペクトル

バッファ層の除去によるフリースタンディングなグラフェンが必要であることを示唆した。また、我々がこれまで行ってきた C 面上のグラフェンと本研究の Si 面上グラフェンでの TERS 増強度を比較した結果、C 面上と同程度の増強度が得られていることを確認した。しかし、測定点によっては C 面よりも増強が大きいところも確認できたことから、TERS 測定による Si 面評価の有用性を示唆することができた。

また、グラフェンナノリボンの TERS 測定の結果から、グラフェンナノリボンのエッジ部分において強い D バンドが観測された。一方で、ナノリボンの内部においては顕著な D バンドが観測されなかった。また、本サンプルに対するラマンマッピングの結果では、グラフェンの層数に比例する G'バンドの FWHM (半値幅) はリボン全体に渡って均一であったことから、内部は均一であり、エッジ部分が Armchair 型のナノリボンであることが示唆された<sup>3)</sup>。

1) S.Vantasin *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 43, (2015), 28993-28999

2) Y.Qi *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 105, (2010), 085502

3) YuMeng You *et al.*, *Appl.Phys.Lett.*, 93, (2008), 163112

## 2P089

フェムト秒近赤外ポンププローブ分光による  
グラフェン-金ナノ構造体系のキャリア緩和過程の解明  
(関学大院・理工<sup>1</sup>, NICT<sup>2</sup>) ○山田 淳史<sup>1</sup>, 久津間 保徳<sup>1</sup>,  
梶 貴博<sup>2</sup>, 金子 忠昭<sup>1</sup>, 玉井 尚登<sup>1</sup>

Carrier dynamics in graphene-gold nanostructure systems  
by femtosecond near-IR pump-probe spectroscopy  
(Kwansei Gakuin Univ.<sup>1</sup>, NICT<sup>2</sup>) ○ Atsushi Yamada<sup>1</sup>,  
Yasunori Kutsuma<sup>2</sup>, Takahiro Kaji<sup>2</sup>, Tadaaki Kaneko<sup>1</sup>, Naoto Tamai<sup>1</sup>

**【序】** グラフェンはディラック点付近で一般的な半導体と異なる線形的なバンド構造をとり、その構造に基づく高いキャリア移動度を示す。この特徴を生かして太陽電池やトランジスタなどのエレクトロニクス材料への応用が期待されている。デバイス応用に際して、特に支持基板を含めたグラフェンのキャリア緩和過程を評価することが重要であり、その有効な評価法としてポンププローブ分光が挙げられる。本研究では、種々の基板上グラフェンに対してフェムト秒近赤外ポンププローブ分光測定を行い、グラフェンのキャリアダイナミクスに及ぼす基板効果を評価したので、これを報告する。一方、ナノ構造体などの閉じた表面を持つ金属は、ある特定の波長の光と金属内部での電子の集団振動の共鳴（局在表面プラズモン共鳴，LSPR）に伴う光吸収を起こし、中でも金ナノ構造体は、可視から近赤外域に大きな LSPR バンドを持つことで知られている。そこでグラフェンの上に光吸収のアンテナとなる金ナノ構造体を作製し、近赤外フェムト秒ポンププローブ分光によりそのキャリアダイナミクス評価することで金からグラフェンへの電子移動を分光学的観点から証明することを目的とした。

**【実験】** サンプルとして SiC, SiO<sub>2</sub>/Si, ガラス基板上グラフェンを用いた。SiC 基板上グラフェンは 4H-SiC(0001)基板の熱分解法によって作製し、他は CVD 法によって銅箔に成膜したグラフェンを各基板に転写したものである（グラフェンプラットフォーム(株)）。グラフェン層数の評価には共焦点顕微鏡を用いた空間分解ラマン分光( $\lambda_{EX} = 488 \text{ nm}$ )により評価した。キャリア緩和過程の評価は、増幅したフェムト秒 Ti:Sapphire レーザーを用い、励起光 800 nm のフェムト秒パルス、観測光 900~1350 nm のフェムト秒白色光で反射光学系を組み、近赤外ポンププローブ分光測定により解析を行った。更に SiO<sub>2</sub>/Si, ガラス基板上グラフェンに真空蒸着で金の蒸着を行い、表面形状を AFM で測定した。これについても同様の光学系を用いてポンププローブ分光によりキャリアダイナミクスを評価した。

**【結果と考察】** Fig. 1 に SiO<sub>2</sub>/Si 基板上グラフェンの空間分解ラマン分光結果を示す。グラフェン層数と I(G)/I(2D)ピーク強度比の関係から、I(G)/I(2D)が 0.74 より小さい領域を 1 層グラフェンとした[1]。50×50  $\mu\text{m}^2$  の領域で約 90%以上の 1 層グラフェンが生成していると評価した。また、他の基板についても同様の方法で評価し、いずれについても概ね 1~2 層グラフェンの生成を確認した。ポンププローブ分光測定の結果、SiO<sub>2</sub>/Si 基板上グラフェンのスペクトルでは近赤外領

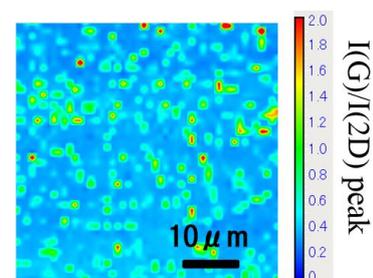


Fig. 1 Raman mapping image of graphene on a SiO<sub>2</sub>/Si substrate.

域において明確なピークは観測されず、非常にブロードなスペクトルを示した。1 ps 付近でシグナルの正負が逆転しており、これは下地 Si の自由キャリア由来のシグナルが観測されていると考えている。Fig. 2 に 1100 nm における SiO<sub>2</sub>/Si 基板上グラフェンのキャリア緩和過程を示す。解析の結果、速い緩和成分の時定数 $\tau_1 = 0.18$  ps (72.2 %), 遅い緩和成分 $\tau_2 = 1.27$  ps (27.8 %)であった。SiC を用いて作製した C 面上グラフェンでは、 $\tau_1 = 0.23$  ps であるのに対してバッファ層を有する Si 面上グラフェンは $\tau_1 = 0.1$  ps で超高速減衰が支配的であった。そのことから、速い緩和成分がグラフェンと支持基板との結合に強く影響していることが示唆された。本実験では SiO<sub>2</sub>/Si 基板上グラフェンの速い緩和過程が C 面上グラフェンの振る舞いに近く、グラフェン-基板間の相互作用が小さいことが示唆された。これをグラフェンのキャリアと下地基板のフォノンの散乱過程であるリモートフォノン散乱[2]が原因であると考えた。

プラズモンとグラフェンの相互作用を調べるため、真空蒸着により SiO<sub>2</sub>/Si, ガラス基板上グラフェンに金ナノ構造体を作製した。AFM でこの表面状態を観察したところ、薄膜状になっていることが分かった(Fig. 3)。また、ガラス基板上グラフェンに作製した金ナノ構造体の吸収スペクトルから 700 nm 付近にピークを持つ LSPR バンドの存在を確認した(Fig. 4)。SiO<sub>2</sub>/Si 基板上グラフェンでは同様にポンププローブ分光測定を行った。スペクトルにおいては、グラフェン-金ナノ構造体系でグラフェンに類似したシグナルを観測された。また、SiO<sub>2</sub>/Si-金ナノ構造体系において長波長側に金の吸収はほとんど観測されなかった。ダイナミクスにおいては、金を励起しているのにグラフェン由来の速い緩和成分を観測され、励起光強度を上げるとグラフェン-金ナノ構造体系において金由来と思われる遅い緩和成分が現れた。以上より金からグラフェンへの電子移動が示唆された。更にダイナミクスの解析から平均電子移動の時定数及び電子移動効率を求めた。しかし、蒸着法では金ナノ構造体の精密さに欠けるため、更に電子線リソグラフィによりナノメートルスケールの構造体の作製を行う予定である。

## 参考文献

- [1] I. Calizoet, A. A. Balandin et al., *J. Appl. Phys.* **106**, (2009) 043509
- [2] L. Huang, H. Xing et al., *Surface Science* **605** (2011) 1657.
- [3] C. Yu, Z. H. Feng et al., *Appl. Phys. Lett.*, **102** (2013) 13107
- [4] H. Hirai, M. Ogawa et al., *J. Appl. Phys.*, **116**, (2014) 083703

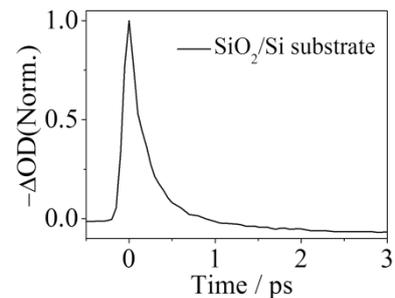


Fig. 2 Transient absorption dynamics of graphene on a SiO<sub>2</sub>/Si substrate observed at 1100 nm.

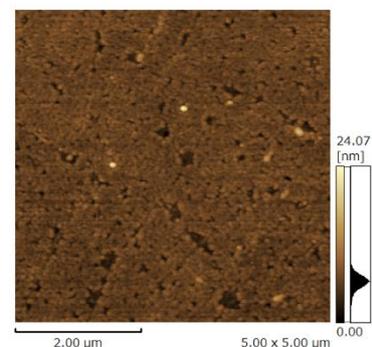


Fig. 3 AFM image of graphene-gold nanostructure systems (graphene on glass substrate).

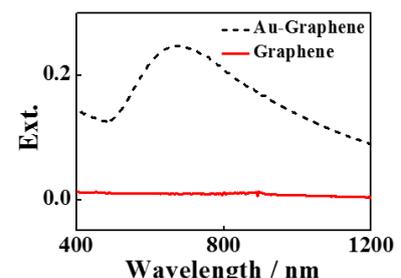


Fig. 4 LSPR band of gold nanostructure on the graphene/glass substrate.

2P090

## 近接場光学顕微鏡による金ナノ構造体の一光子発光特性の究明

(早稲田大学) ○今枝佳祐, 井村考平

### Photoluminescence from single gold nanostructures studied by near-field optical microscopy

(Waseda university) ○Keisuke Imaeda, Kohei Imura

【序】金ナノ構造体は、自由電子の集団振動であるプラズモン共鳴が光励起されるため、バルクとは異なる特異な光学特性を示す。特に、プラズモン共鳴による光電場増強効果は、光化学反応場や高感度センサー、生体イメージングなどに応用できることから注目を浴びている。金ナノ構造体を新規光科学材料として応用する上で、その発光特性について知見を得ることは重要である。これまでに、金ナノ構造体が近赤外光パルスにより可視域に強い二光子発光を示し、その発光が電子-ホール対の再結合に起因することが報告されている。一方、金ナノ構造体の一光子発光については報告例が少なく、幾つかの発光メカニズムが提唱されているがその詳細は不明である。この発光メカニズムについて知見を得るためには、高空間分解能で単一金ナノ構造体の一光子発光を測定することが有効であると考えられる。本研究では、走査型近接場光学顕微鏡を用いて金ナノ構造体の一光子発光特性を可視化し、その空間特性から発光起源を評価することを目的とした。

【実験】塩化金酸、クエン酸ナトリウム、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリドを含む水溶液を加熱することにより、金ナノプレートを化学的に合成した。ガラス基板上に金ナノプレートを分散して測定試料として用いた。開口型近接場光学顕微鏡（開口径 < 100 nm）を用いて試料の光学測定を行った。光源にハロゲンランプを用いてナノプレートの表面形態を測定しながら近接場透過測定を行った。また、連続波レーザー（励起波長 532, 633, 785 nm）を用いて試料を励起し、試料からの一光子発光を測定した。さらに、モードロックチタンサファイヤレーザー（中心波長 800 nm, 繰り返し周波数 80 MHz, パルス幅 < 20 fs）を用いて二光子発光測定を行った。

【結果と考察】図 1 に測定した金三角形ナノプレート二量体の走査型電子顕微鏡（SEM）像を示す。SEM 像および表面形態像から、ナノプレートの一辺が約 500 および 750 nm, 厚み約 25 nm であることがわかった。金ナノプレート上で近接場透過スペクトルを測定した結果、可視から近赤外域に複数の吸収ピークを示すことがわかった。図 2(a)に吸収ピーク波長 770 nm で観測した近接場透過イメージを示す。図中の暗部は、ナノプレートの吸収および散乱により透過光強度が減少している部位である。図から、プレート面内に周期的な空間構造が可視化されていることがわかる。この空間構造は、プレートに励起されるプラズモンの空間特性を反映していると考えられる。また、観測波長に依存して近接場透過像が顕著に変化することも確認した。これらの結果から、透過スペクトルで観測される複数の吸収ピークは、モードの次数が異なるプラズモン共鳴に帰属されると考えられる。

励起波長 532 nm で同一のナノプレート二量体を測定した結果、波長 630 nm にピークを持つブロードな一光子発光が観測されることがわかった。波長 532 nm で金のバンド間遷移を励起できることや発光ピークがフェルミ面近傍の金のバンド間エネルギー (~650 nm) と概ね一致することから、発光が金のバンド間遷移に起因すると予想される。発光波長で観測した一光子発光イメージを図 2(b)に示す。図から、プレートの頂点で発光強度が増大していることがわかる。これは、アンテナ効果によって頂点に形成される増強光電場により発光が増強していることを示している。また、プレートの内部では発光が観測されず、ガラス基板に比べて信号強度が減少している。これは、バックグラウ

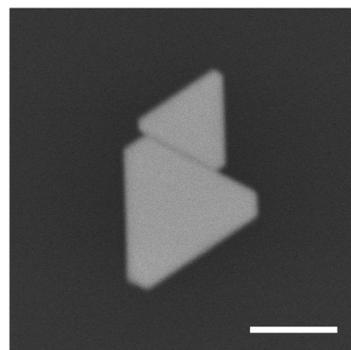


図 1. 金ナノプレート二量体（一边：500 および 750 nm、厚み 25 nm）の走査型電子顕微鏡像。スケールバー：500 nm。

ンドとして観測される近接場プローブからの散乱光がプレートにより吸収されたためだと考えられる。励起波長 633 nm で同様の測定を行った結果、波長 670-800 nm にブロードな発光が観測された。図 2(c)に、発光波長で観測した一光子発光イメージを示す。図 2(b)とは異なり、プレートの辺縁部および内部で強い発光が周期的に観測され。この空間構造は、図 2(a)よりも空間パターンの周期が短いことから、波長 633 nm で共鳴励起されるプラズモンの空間特性を反映していると考えられる。この結果は、図 2(b)の結果とは異なり、励起波長 633 nm ではプラズモンの共鳴効果により発光が増強していることを表している。励起波長 633 nm では金のバンド間遷移を励起できないことから、観測された発光はプラズモンもしくはバンド内遷移に起因すると予想される。

図 2(d)にナノプレート二量体の二光子励起イメージを示す。図からナノプレート内に周期的な空間構造が可視化されていることがわかる。また、プレート間のギャップで非常に強い二光子発光が観測されている。これは、二光子発光がナノプレートに励起されるプラズモン共鳴だけでなく、ギャップにおいて形成される増強光電場により増大したことを示している。

以上のように、励起波長に依存してナノプレートで観測される発光波長および近接場励起イメージが顕著に変化することが明らかとなった。今後、様々な形状の金ナノ構造体に関して研究を行うことで、一光子発光の起源を解明できると期待される。

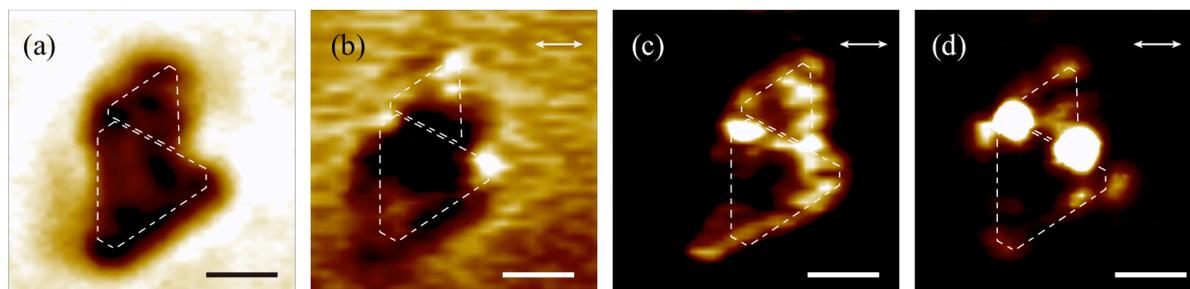


図 2. 金ナノプレート二量体の(a)近接場透過イメージ（観測波長 770 nm）、(b, c)近接場一光子発光イメージ（励起波長：(b) 532 nm, (c) 633 nm）、(d)近接場二光子発光イメージ（励起波長 800 nm）。図中の白点線および白矢印は、ナノプレートの概形と入射偏光を表す。スケールバー：500 nm。

## 2P091

### 真正細菌の Cl<sup>-</sup>ポンプと H<sup>+</sup>ポンプの機能転換の構造基盤の赤外分光研究

(名工大・院工<sup>1</sup>, JST さきがけ<sup>2</sup>)

○野村 祐梨香<sup>1</sup>, 井上 圭一<sup>1,2</sup>, 伊藤 奨太<sup>1</sup>, 神取 秀樹<sup>1</sup>

### Infrared spectroscopic study of structural basis of functional conversion of eubacterial Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> pump

(Nagoya. Inst. Tech.<sup>1</sup>, JST PREST<sup>2</sup>)

○Yurika Nomura<sup>1</sup>, Keiichi Inoue<sup>1,2</sup>, Shota Ito<sup>1</sup>, Hideki Kandori<sup>1</sup>

**【序】** 光駆動イオンポンプとして機能する微生物型ロドプシンは過去に古細菌から見つかり、光のエネルギーを使って H<sup>+</sup>をポンプするバクテリオロドプシン(BR)や Cl<sup>-</sup>をポンプするハロロドプシン(HR)が知られている。BRは1つのアミノ酸変異により Cl<sup>-</sup>ポンプに機能転換できるが[1]、HRの同じ部位を変異しても H<sup>+</sup>ポンプにはならない[2]。このような古細菌型ロドプシンにおける機能転換の非対称性については、活性中心における水素結合構造が要因であると考えられている[2]。一方、近年、真正細菌からも H<sup>+</sup>ポンプ[3]、Cl<sup>-</sup>ポンプ[4]が見つかり、

ポンプ機能に重要と考えられているのが三本目の  $\alpha$ -helix (Helix C)上に存在するアミノ酸残基である。H<sup>+</sup>ポンプ型ロドプシンではレチナールから H<sup>+</sup>を受け取る Asp とその後でレチナールに H<sup>+</sup>を渡す酸性残基 (古細菌では Asp、真正細菌では Glu) が保存され、その間にある Thr と合わせて DTD(E)モチーフと呼ばれる。古細菌の Cl<sup>-</sup>ポンプが TSA モチーフを持つ一方、真正細菌の Cl<sup>-</sup>ポンプでは H<sup>+</sup>ポンプの酸性残基が Asn と Gln に置き換わっており NTQ モチーフと呼ばれる (Fig. 1)。これらのモチーフは保存性が高く機能に重要と考えられているが、モチーフだけで輸送するイオンの選択性が決まるのか、他の要因が機能の決定に関わるのかは不明である。これに対し一方の分子のアミノ酸を別のタイプのロドプシンのアミノ酸に順次置換し機能の転換を試みることで、イオン選択性の違いを生み出しているアミノ酸を明らかにすることができると考えられる。そこで今回、真正細菌の Cl<sup>-</sup>ポンプと H<sup>+</sup>ポンプについて相互に機能転換することで機能を決定する要因の解析を試み、さらに過渡吸収測定とフーリエ変換赤外分光 (FTIR)測定を行い、その光反応の解析およびそれらの分子構造を調べた。

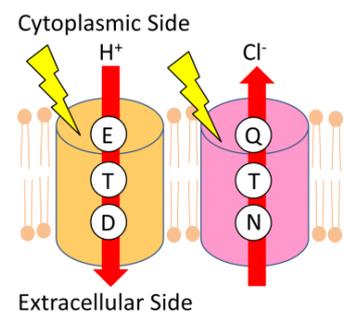


Fig. 1 H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> pump rhodopsins

**【実験】** 本研究では、H<sup>+</sup>ポンプである *Gloeobacter violaceus* 由来の *Gloeobacter* rhodopsin (GR)、Cl<sup>-</sup>ポンプである *Fulvimarina pelagi* 由来の *Fulvimarina* rhodopsin (FR)を鋳型としてアミノ酸変異を導入した。変異を導入したロドプシンを大腸菌で発現させ、大腸菌懸濁液の光照射に伴う pH 変化を pH 電極で測定することでイオン輸送活性を評価した。また、変異したロドプシンの光反応については過渡吸収測定、FTIR 測定を行った。

**【結果と考察】** 最初に、Cl<sup>-</sup>ポンプをH<sup>+</sup>ポンプに機能転換するために、FRのNTQモチーフをH<sup>+</sup>ポンプ型のDTEモチーフにしたロドプシンを大腸菌で発現し、大腸菌の懸濁液の光照射に伴うpH変化をpH電極で測定した。その結果FR DTEはCl<sup>-</sup>ポンプ活性が消失し、H<sup>+</sup>ポンプ活性も現れない結果となった。しかし、このFR DTEに細胞質側に存在するアミノ酸残基Ser255をH<sup>+</sup>ポンプで保存されているPheに変異したところ、H<sup>+</sup>ポンプ活性が見られた(Fig. 2b)。一方、H<sup>+</sup>ポンプからCl<sup>-</sup>ポンプへの機能転換は、さらに多くの変異を導入しても機能を変えることはできなかった(Fig. 2d)。このH<sup>+</sup>ポンプへの機能転換に成功した変異体を過渡吸収測定により光反応を観測すると、H<sup>+</sup>ポンプに機能転換した変異体では、H<sup>+</sup>ポンプに特徴的な、シッフ塩基が脱プロトン化し短波長に吸収を持つM中間体の存在が観測され、天然のH<sup>+</sup>ポンプと同様のフォトサイクルを示した(Fig. 2e)。一方、Cl<sup>-</sup>ポンプに機能転換できない変異体では、Cl<sup>-</sup>イオン結合部位周辺のアミノ酸をCl<sup>-</sup>ポンプ型に置換してもCl<sup>-</sup>の結合は見られず、フォトサイクルも天然のCl<sup>-</sup>ポンプのCl<sup>-</sup>非結合型に似通った光反応を示した。また、より詳細な構造情報を得るため、FTIR測定を行った。古細菌型ロドプシンの研究では、H<sup>+</sup>ポンプ機能を持つロドプシンは活性中心に2400 cm<sup>-1</sup>以下のO-D伸縮振動を持つ強い水素結合をする水分子を持つことが示されている。古細菌型Cl<sup>-</sup>ポンプをH<sup>+</sup>ポンプ型に近づけたが機能転換が達成できない10重変異体では強い水素結合をする水分子は観測されない。従ってH<sup>+</sup>ポンプ機能を示すには、強い水素結合をする水分子が必須であることが知られている。そこで、まずFR WTのFTIR測定で、O-D伸縮振動領域を観測し、水分子の水素結合環境を調べた。その結果、FR WTは2400 cm<sup>-1</sup>以下の波数を持つ強い水素結合をする水分子が存在することが観測された。さらにH<sup>+</sup>ポンプに機能転換した変異体でもより低波数にそのような水分子を持つ信号を得た。

今回、真正細菌のCl<sup>-</sup>ポンプおよびH<sup>+</sup>ポンプを相互に機能転換を試みた結果、Cl<sup>-</sup>ポンプからH<sup>+</sup>ポンプへの機能転換は達成された。このことはモチーフだけで機能は決定されず、さらにモチーフ以外のアミノ酸を変異することでイオンの選択性が決まることを示唆している。一方、H<sup>+</sup>ポンプからCl<sup>-</sup>ポンプへは、Cl<sup>-</sup>ポンプからH<sup>+</sup>ポンプへの機能転換で行った変異より多くの変異を加えても機能転換されず、古細菌と真正細菌が全く逆の非対称性を示した結果となった[5]。また真正細菌のCl<sup>-</sup>ポンプであるFRは活性中心に比較的に強い水素結合をする水分子を持つことが、容易にH<sup>+</sup>ポンプに機能転換できた要因であると考えられる。今後は、それぞれの詳細な輸送メカニズムを調べていく予定である。

**【引用文献】** 1. Sasaki et al., *Science*, **269**, 73-75 (1995).

2. Muroda et al., *Biochemistry*, **51**, 4477-4684 (2012). 3. Ernst et al., *Chem. Rev.*, **114**, 126-163 (2014).

4. Inoue et al., *JPCB*, **118**, 11190-11199 (2014). 5. Inoue et al., *J. Biol. Chem.*, **291**, 9883-9893 (2016).

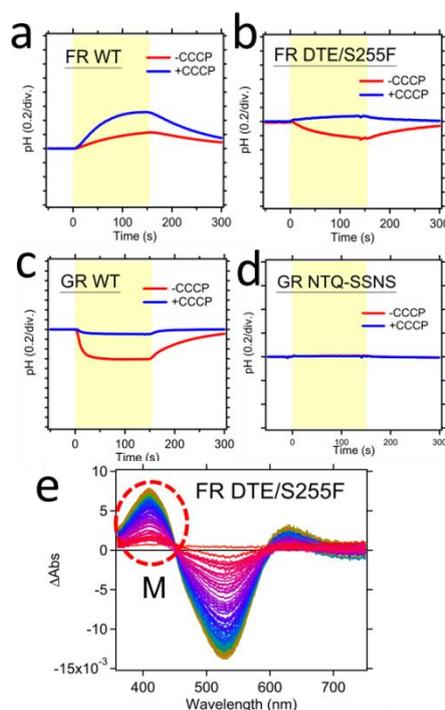


Fig. 2 Pump activity and transient absorption spectra of mutants

## 2P092

### 二光子吸収分光法による青緑色蛍光タンパク質 eCFP の構造不均一性の観測

(東邦大理<sup>1</sup>・理研田原分子分光<sup>2</sup>・理研光量子工学<sup>3</sup>)

○細井 晴子<sup>1</sup>・田山 亮<sup>1</sup>・高見 朋代<sup>1</sup>・竹内 佐年<sup>2,3</sup>・田原 太平<sup>2,3</sup>

**【序】** 蛍光タンパク質は生きたままの細胞や組織のイメージングにおいて重要なツールである。観察結果の適切な解釈や新規蛍光タンパク質の開発には、その基礎となる電子状態や発光機構に関する知見が不可欠である。本研究で対象とするのは FRET ドナーとして最も広く利用されている青緑色蛍光タンパク質 cyan fluorescent protein (CFP) である。CFP の一光子吸収 (OPA) スペクトルには 435 nm と 451 nm に 2 つのピークが現れるが、その起源は明らかでない。Fig. 1 に示すように 3 つの異なる機構、すなわち、(a) 独立した 2 種類の  $S_1 \leftarrow S_0$  遷移、(b) 2 種類の異なる電子励起状態への遷移 ( $S_1 \leftarrow S_0$  遷移と  $S_2 \leftarrow S_0$  遷移)、(c) 2 種類の異なる振動励起  $S_1$  状態への遷移、が提案されており、これらの機構をめぐる議論が続いている。本発表では CFP の OPA スペクトルの 2 つのピークの起源を明らかにすることを目的として、CFP の 1 つである enhanced CFP (eCFP) と発色団モデル化合物 cCFP (Fig. 2b) の二光子吸収 (TPA) スペクトル測定を行った結果を報告する。

**【実験】** TPA スペクトルはマルチプレックス二光子吸収法 [1] により測定した。 $\omega_1$  に近赤外光 (1300 nm、1397 nm および 1750 nm)、 $\omega_2$  に白色光 (450-750 nm) を用い、CCD によるマルチチャンネル検出を行った。

**【結果と考察】** cCFP の OPA スペクトルはメタノール中、DMSO 中ともに単一のピークを示した。また各 OPA スペクトルは、対応する TPA スペクトルとよく一致した (Fig. 3a, b)。この結果は、cCFP は一光子励起でも二光子励起でも同じ  $S_1$  状態に励起され、観測波長領域内の他の電子励起状態の寄与は小さいことを意味している。cCFP の量子化学計算においても  $S_1 \leftarrow S_0$  遷移が他の遷移に比べて十分に大きな振動子強度をもち、実験結果と一致する結果が得られた。一方、eCFP の OPA スペク

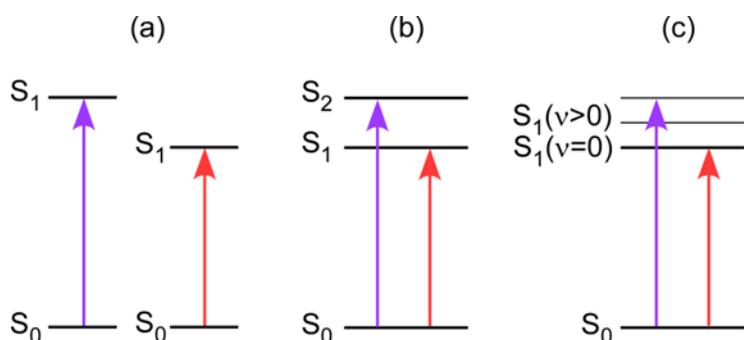


Figure 1. CFP の吸収スペクトルの二つのピークの起源に関する 3 つの異なる機構。(a) 独立した 2 種の  $S_1 \leftarrow S_0$  遷移。(b) 2 種の電子励起状態への遷移 ( $S_1 \leftarrow S_0$  遷移と  $S_2 \leftarrow S_0$  遷移)。(c) 2 種の異なる振動励起  $S_1$  状態への遷移。

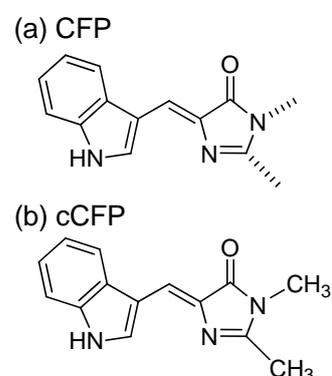


Figure 2. (a) CFP の発色団と (b) 発色団モデル化合物 cCFP の構造。

トルには2つのピークが観測される (Fig. 3c 黒線) が、eCFPはcCFPと同じ構造の発色団をもちcCFPとよく似た電子構造をもつと考えられるため、eCFPの2つのOPAピークが異なる電子励起状態に由来するとは考えにくい。従って、2つのピークが $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移と $S_2 \leftarrow S_0$ 遷移に由来するというFig. 1(b)の機構は除外できるといえる。

次に、2つの異なる振動励起 $S_1$ 状態への遷移によって2つのOPAピークが生じるという機構 (Fig. 1c)について検討した。この場合、eCFPの2つのOPAピークは $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移におけるフランク・コンドン因子 (振動構造) を反映しているといえる。通常、対応するTPAスペクトルも同じフランク・コンドン因子を反映するため、OPAとTPAスペクトルは同じ形状を示すと期待される。しかし、Fig. 3cに示す通り、eCFPのOPAとTPAスペクトルは一致しないことが分かった。この測定結果は、2つの異なる振動励起 $S_1$ 状態への遷移を考えることでは説明することができない。さらに、発色団周辺アミノ酸であるY145またはH148を置換した一部の一置換変異体は、野生型で見られた2つのピークを有するOPAスペクトルとは明らかに異なる形状を示すことが分かった (図省略)。周辺アミノ酸の置換により発色団の振動構造が大きく変化することは考えにくいいため、この結果も2つの異なる振動励起 $S_1$ 状態への遷移の考え方では説明することができない。

これらに対し、独立した2種類の $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移 (Fig. 1a) を考えることにより、これまでの観測結果を矛盾なく説明することができる。つまり、発色団の置かれた環境の違いによって2種類のeCFPが生成し、それぞれの $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移エネルギーが異なる (435 nmと451 nm) ため、それらが2つのOPAピークとして現れると理解することができる。また、一置換変異体で観測されたOPAスペクトル形状の変化は、周辺アミノ酸の置換により発色団環境が変化し、その結果、2つの $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移エネルギーの差が変化するためと考えられる。さらに、eCFPのOPAとTPAスペクトルの違いは、2つのピーク波長間で一光子吸収確率の比と二光子吸収確率の比が異なるためと捉えることができる。

【結論】eCFPとその発色団モデル化合物の二光子吸収スペクトルから、eCFPのOPAスペクトルに見られる2つのピークは発色団周辺の環境が異なる2種類のeCFPの存在に起因することが示唆された。

【参考文献】[1] H. Hosoi, S. Yamaguchi, H. Mizuno, A. Miyawaki, T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 2761; H. Hosoi, R. Tayama, S. Takeuchi, T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* 630 (2015) 32.

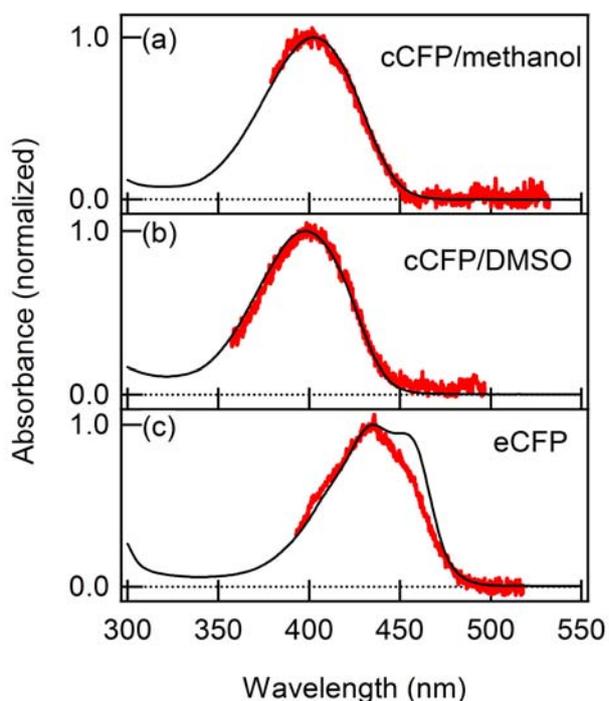


Figure 3. 一光子 (OPA)、及び二光子 (TPA) 吸収スペクトル。cCFPの (a) メタノール溶液と (b) DMSO 溶液、および(c) eCFP。

## 2P093

高濃度二酸化炭素条件下で培養したシアノバクテリアの光応答

(神戸大院・理<sup>1</sup>, 神戸大院・農<sup>2</sup>, 神戸大分子フォト<sup>3</sup>)

○藤本かおり<sup>1</sup>, 嶋川銀河<sup>2</sup>, 三宅親弘<sup>2</sup>, 秋本誠志<sup>1,3</sup>

### Light adaptation of cyanobacteria grown under high-concentration carbon dioxide

(Kobe Univ)

○Kaori Fujimoto, Ginga Shimakawa, Chikahiro Miyake, Seiji Akimoto

【序論】シアノバクテリアは、酸素発生型光合成生物の中で最も始原的であり、光合成のモデル生物として広く用いられている。チラコイド膜内に光化学系 I (PS I) と光化学系 II (PS II) を含み、チラコイド膜外にフィコビリソーム (PBS) と呼ばれるアンテナ色素複合体が結合している。PS I や PS II には光合成色素としてクロロフィル *a* (Chl *a*) やカロテノイド

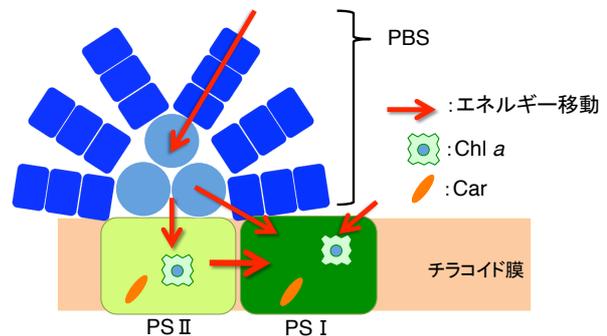


図1 光エネルギー捕集の模式図

(Car) を持ち、PBS はフィコビリリン色素を持つ。光合成色素によって光エネルギーが捕集され (図1)、反応中心へ励起エネルギーとして伝達された後、電子伝達反応が駆動される。PS I と PS II は協同的に機能するため、両光化学系にバランスよくエネルギーが流れる必要がある。シアノバクテリアは環境変化に応答する機構を持ち、光化学系間の直接的なエネルギー移動の調整やPBS から PS I、PBS から PS II へのエネルギー移動の調節などが提案されている[1]。

最近、Flavodiiron タンパク質である FLV2 と FLV4 は、光化学系の光阻害などの原因となる活性酸素の生成を防ぐ機構に関連し、低濃度 CO<sub>2</sub> 条件への移行で機能することが報告されている[2,3]。全てのシアノバクテリアが FLV2/4 を持っているわけではなく、*Synechocystis* sp. PCC 6803 は FLV2/4 を持っているのに対して、*Synechococcus* sp. PCC 7942 は持っていない。本研究では、高濃度 CO<sub>2</sub> 条件下で培養した、これら 2 種のシアノバクテリアのエネルギー移動過程に着目し、低濃度条件への移行に伴う光応答について分光学的手法により考察した。

【実験】高濃度 CO<sub>2</sub> 条件下、BG-11 (液体培地) で培養したシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 PCC 6803) および *Synechococcus* sp. PCC 7942 (以下 PCC 7942) を、大気 CO<sub>2</sub> 濃度下で赤色光 (220 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) を照射し続けた。照射直後は CO<sub>2</sub> が豊富にある (B とする) が、照射し続けると CO<sub>2</sub> は消費され、低濃度 CO<sub>2</sub> 条件へと移行していく (C とする)。光照射前を A とし、A、B、C の状態のサンプルを液体窒素で凍結し、積分球を用いて蛍光ス

ペクトルの絶対強度測定、および、ピコ秒時間相関単一光子計数法を用いて蛍光減衰曲線の測定を行った。

【結果と考察】図2にPCC 6803とPCC 7942の定常蛍光スペクトルの結果を示す。励起波長はPBSを選択的に励起する590 nmとし、サンプルに吸収された光量で規格化を行った。両サンプルで、PBSからの蛍光(660 nm付近)に加え、PS IIからの蛍光(695 nm付近)及びPS Iからの蛍光(720 nm付近)が観測された。PBS励起によりPS IとPS IIからの蛍光が観測されたのは、PBSが光化学系にエネルギーを渡すためである。

まず、PCC 6803(図2:左)では、定常蛍光スペクトルにおいてAからCにかけてPS IIの蛍光強度が増加した(Aの蛍光強度を1とすると、Bは1.06、Cは1.18)。この原因として、PS IIの励起状態寿命の変化とPBSからのエネルギー移動の変化が予想される。PS IIの平均寿命値は285 ps(A)、345 ps(B)、375 ps(C)(Aの平均寿命値を1とすると、Bは1.21、Cは1.31)であり、蛍光強度の変化の方が小さかった。したがって、AからCにかけてPBSから両光化学系へ移動する励起エネルギー量が増加したためであると考えられる。

次に、PCC 7942(図2:右)の結果に移る。PCC 6803と同様に、定常蛍光スペクトルにおいてAからCにかけてPS IIからの蛍光強度は増加し、蛍光減衰曲線においてもAからCにかけてPS IIの平均寿命値は長くなった。しかし、PCC 6803とは異なり、PCC 7942では減衰曲線の寿命値の変化よりも定常蛍光の強度の変化の方が大きかった。このことから、PCC 6803とPCC 7942では、低濃度CO<sub>2</sub>への移行に伴うエネルギー移動の調節が異なることが考えられる。

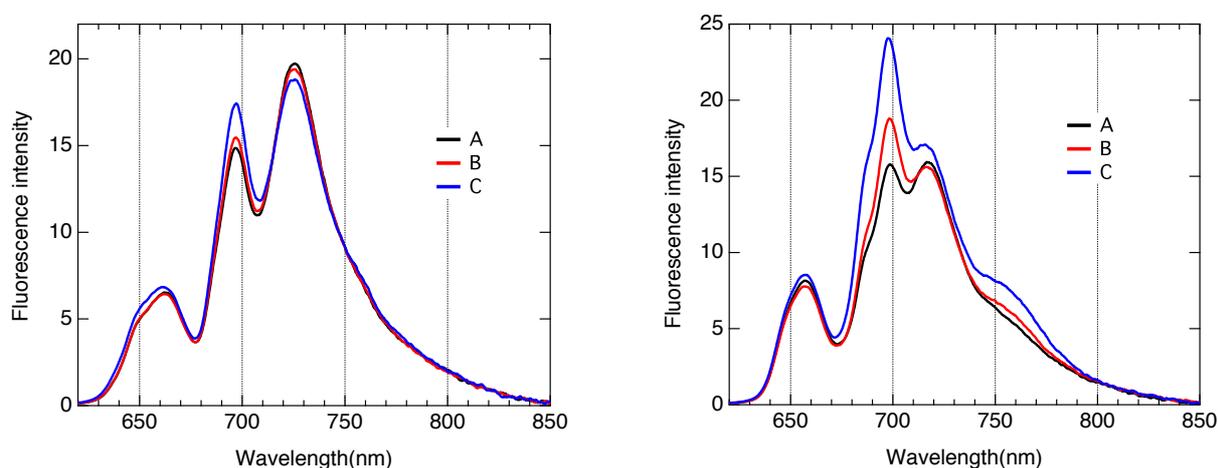


図2 定常蛍光発光スペクトル(左:PCC 6803、右:PCC 7942)

【参考文献】 [1] D. Kirilovsky, *Photosynthesis Research* **126** (2015) 3. [2] P. Zhang, Y. Allahverdiyeva, M. Eisenhut, E.M. Aro, *PLoS ONE*. **4** (2009) e5331. [3] G. Shimakawa, K. Shaku, A. Nishi, R. Hayashi, H. Yamamoto, K. Sakamoto, A. Makino, C. Miyake, *Plant Physiology*. **167**, (2015) 472.

## 光依存的な DNA 結合タンパク質 EL222 の 光刺激構造変化のダイナミクス

○高門 輝, 中曽根 祐介, 寺嶋 正秀  
(京大院 理)

### Photo-induced reaction dynamics of DNA-binding protein EL222

○Akira Takakado, Yusuke Nakasone, Masahide Terazima  
(Kyoto Univ. Sci.)

#### 【序】

生物は様々な光センサータンパク質を持っており、光励起されたタンパク質がその構造を変化させ、下流分子との会合状態の変化を引き起こすことにより種々の生理機能を制御している。この光応答反応を時間分解検出することは分子レベルでのシグナル伝達機構を明らかにするために不可欠である。海洋性バクテリア *Erythrobacter litoralis* 由来のタンパク質 EL222 は光受容ドメイン(LOV)と DNA 結合ドメイン(HTH)からなるタンパク質である[1]。暗状態でモノマー構造を持つ EL222 は、青色光を照射するとタンパク質の三次構造が変化し、ダイマー化することで特異的認識配列を含む DNA と結合し、下流配列の転写を促進する (図 1) [1,2]。EL222 の生理的機能として、DNA 修復酵素の発現を促すことにより紫外光で損傷を受けた DNA を修復するなどの役割が予想されている[2]。また光により転写活性を制御できる特性を活かして、人工的に転写活性を制御する光遺伝学への応用も行われており[3]、EL222 は基礎研究・応用研究両面から注目されているタンパク質である。本研究では、そのシグナル伝達機構を明らかにするため、光励起された EL222 が構造変化を起こして会合状態を変化させる反応、およびそれに伴い DNA と結合力が変化する過程を時間分解検出することを目指した。

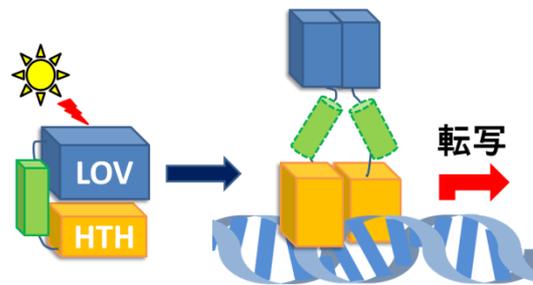


図 1. EL222 の反応モデル

#### 【実験】

EL222 タンパク質は大腸菌を用いて発現させ、クロマトグラフィーによる精製を行った。反応ダイナミクス検出には主に過渡回折格子法(TG法)を用いて、反応に伴う構造・会合状態変化を屈折率および分子の拡散係数の時間変化として検出した。励起光として 462nm のパルスレーザーを、プローブ光として 840nm の連続光レーザーを用いた。まず DNA を含まない EL222 溶液での測定を行い、EL222 タンパク質の光反応を検出した。さらに EL222 と DNA との混合溶液での測定を行い、タンパク質と DNA の結合ダイナミクスの検出を行った。EL222 と結合する DNA 配列は参考文献[1]を基に決定し、認識配列を含む 45 塩基対の 2 本鎖 DNA をタンパク質と混合して測定を行った。

## 【結果と考察】

### タンパク質の二量体形成反応

図2にDNAを含まない場合のEL222全長タンパク質のTG測定の結果を示す。拡散信号の時間発展を解析することで、数百ミリ秒程度の反応速度で拡散係数の減少を伴う反応が光誘起されることがわかった。反応物および生成物の分子拡散係数はそれぞれ  $D_{\text{反応物}}=9.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  および  $D_{\text{生成物}}=5.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  と見積もられた。反応物の拡散係数として得られた値は、EL222の暗状態での結晶構造（モノマー構造）

の拡散係数として妥当なものである[1]。タンパク質濃度を変えて同様の測定をしたところ、拡散係数変化の速度がタンパク質濃度に比例することが分かった。これはダイマー化反応が拡散係数減少の要因であることを示している（二次の反応速度定数:  $k = 4.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ）。また拡散係数の減少度合いが二分子間の会合では説明できないほど大きいことから、ダイマー化反応に加え、タンパク質の構造変化も光誘起されることがわかった。以上、本研究では初めてEL222の光依存的な構造変化および二量体形成反応を時間分解検出することに成功した。

### タンパク質とDNAとの結合反応

EL222全長タンパク質とDNAとの混合系でのTG信号の測定を行ったところ、DNA存在下ではTG信号強度に大きな増大がみられた（図3）。この信号強度はDNA濃度に依存して増大することがわかり、タンパク質とDNAとの光依存的な会合反応を拡散係数の減少として捉えたものと同定された。また、この信号強度の増大はDNA結合ドメインを含まない試料（LOVドメインのみ）とDNAとの混合時には

観測されなかったことから、DNA結合ドメインとDNAとの特異的な結合を捉えたものと考えられる。これらの信号の解析により、タンパク質とDNAとの結合速度を見積もったところ（ $k' = 7.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ）、その値がEL222の二量体形成速度よりも速いことがわかった。このことよりEL222はDNAと結合したのち、二量体化反応を起こすという反応スキームが提唱される。これらの結果を基にEL222の構造変化・会合状態変化およびDNAとの結合反応のダイナミクスについて議論する。

## 【参考文献】

- [1]A. Nash et al. *PNAS* 2011, 108, 9449-9454
- [2]G. Rivera-Cancel et al. *Biochemistry* 2012, 51, 10024-10034
- [3]L. Motta-Mena et al. *Nature chemical biology* 2014, 10, 196-202

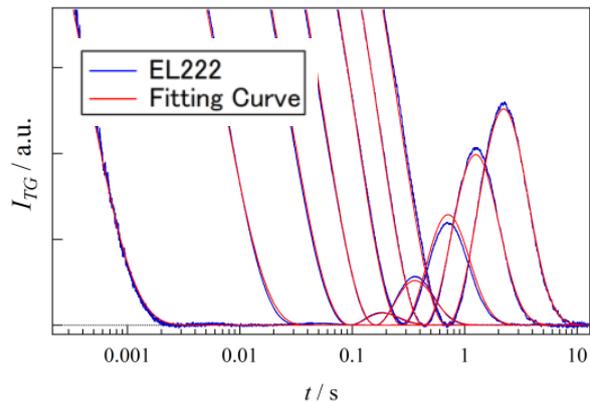


図2. EL222タンパク質のTG信号

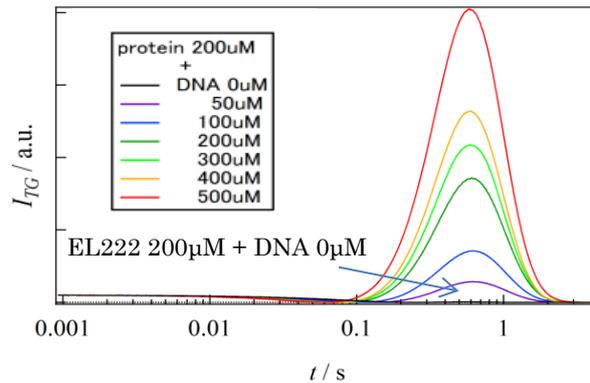


図3. EL222+DNA混合系のTG信号

光化学系 II 酸素発生系の形成過程における  $Mn^{2+}$  親和サイトの位置決定(分子科学研究所<sup>1</sup>、名古屋大学院・理<sup>2</sup>) ○浅田瑞枝<sup>1,2</sup>、三野広幸<sup>2</sup>High-affinity site of  $Mn^{2+}$  at the elementary step of Photoactivation of oxygen evolving complex in photosystem II(Institute for Molecular Science<sup>1</sup>, Nagoya University<sup>2</sup>)○Mizue Asada<sup>1,2</sup> and Hiroyuki Mino<sup>2</sup>

【序】植物やシアノバクテリアの光化学系 (PS) II は、光合成反応において酸素発生反応を担うタンパク質複合体である。Mn クラスターは PS II の水分解反応の直接の触媒となる部分で、4 つの Mn、1 つの Ca、5 つの O 原子で構成される。Mn クラスターを除去した PS II では酸素発生活性が失われるが、Mn クラスターが除去された PS II を含む溶液に  $MnCl_2$  と  $CaCl_2$  を加え光照射すると、Mn クラスターが再構築され活性が戻る。PS II の形成時にも、同様の反応を経て Mn クラスターが構築されると考えられている (光活性化)。図 1 に光活性化の二量子反応モデルを示す。まず Mn クラスターがない PS II に 1 つの  $Mn^{2+}$  が結合する ( $IM_0$ )。PS II に結合した  $Mn^{2+}$  は光照射により酸化され  $Mn^{3+}$  になる ( $IM_1$ )。Ca<sup>2+</sup> 存在下では構造変化が引き起こされ、2 つめの  $Mn^{2+}$ 、Ca<sup>2+</sup> が PS II に結合する ( $IM_1^*$ )。さらなる光照射により 2 つの  $Mn^{3+}$  が結合した中間体が形成される ( $IM_2$ )。その後さらに 2 つの  $Mn^{2+}$  が結合し、最終的に酸素発生活性がある Mn クラスターが形成される。 $IM_0$  状態には、 $Mn^{2+}$  が 1 つだけ特異的に結合する親和サイトが存在することが明らかになっているが、酸素発生系内のどの位置に  $Mn^{2+}$  が結合し、どのように光活性化反応が進むか、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

ESR 測定法の一つであるパルス電子-電子二重共鳴 (PELDOR) 法は、2 つの異なる周波数のマイクロ波を用いて電子スピン間に働く双極子相互作用を測定し、10-100 Å の精度でスピン間距離を決定することができる。PS II には、光照射により形成される安定なチロシンラジカル  $Y_D\cdot$  が存在し、PELDOR 法による電子スピン間距離測定の指標として用いることができる。本研究では特異的な親和サイトに結合した  $Mn^{2+}$  と  $Y_D\cdot$  間の距離測定を行い、光活性化  $IM_0$  状態における酸素発生系の構造を議論する。

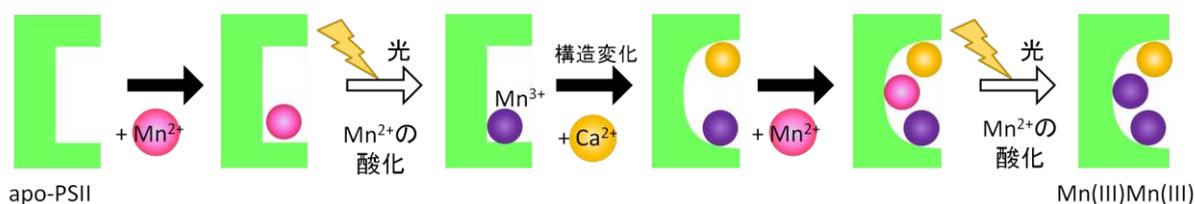


図 1 光活性化の二量子反応モデル

【実験】PS II 膜標品はハウレンソウから単離した。高濃度の NaCl を含む緩衝液で PS II を洗浄し表在性タンパク質 PsbP, PsbQ を除去後、 $NH_2OH$  溶液を添加し Mn クラスターを還元除去した。Mn クラスター除去 PS II に対し  $MnCl_2$  を PS II: $Mn^{2+}$  = 1:4 の割合で混合し、 $Mn^{2+}$  を結合さ

せた。パルス ESR 測定では、遠心分離により濃縮した試料を用いた。CW-ESR 測定は室温、ESE 測定及び PELDOR 測定は 8 K で行った。

【結果と考察】 CW-ESR 測定により、PS II に結合する  $Mn^{2+}$  濃度を定量した。遠心分離による濃縮前の緩衝液と、遠心分離後の上澄みに含まれる  $Mn^{2+}$  濃度の比較から、 $MnCl_2$  のみ加えた場合、1 つの PS II あたり 1.4 個の  $Mn^{2+}$  が結合し、 $MnCl_2$  の他に 10 mM  $CaCl_2$  を加えた場合、1 つの PS II あたり 0.4 個の  $Mn^{2+}$  が結合することがわかった。 $Mn$  クラスターを除去した PS II には、 $Mn^{2+}$  が特異的に強く結合するサイトと、 $Ca^{2+}$  により阻害される  $Mn^{2+}$  の非特異的な結合サイトが存在することを確認できた。

$Mn^{2+}$  が結合した PS II のパルス ESR 磁場掃引スペクトルを図 2 に示す。 $Ca^{2+}$  存在下(b, c)、 $Ca^{2+}$  非存在下(a, d)ともに  $Mn^{2+}$  の信号強度が光照射により減少したことから、親和サイトに結合した  $Mn^{2+}$  が酸化され  $Mn^{3+}$  になったことが予想される。PELDOR 測定では  $Mn^{2+}$  イオンを観測し  $Y_D\cdot$  を励起するため、図の矢印の位置でそれぞれ共鳴するマイクロ波周波数を用いた。

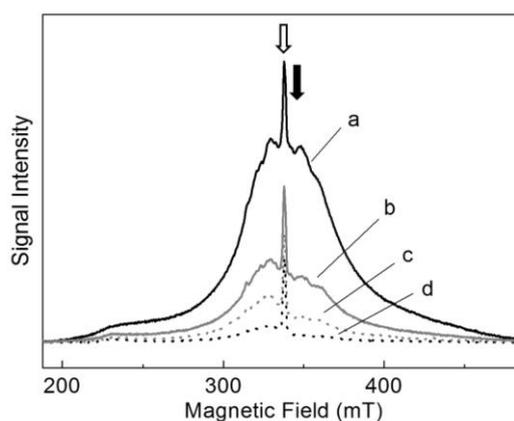


図 2 ESE 磁場掃引スペクトル

PS II の  $Y_D\cdot$ - $Mn^{2+}$  間の PELDOR 測定結果を図 3 に示す。信号周期から  $Mn^{2+}$ - $Y_D\cdot$  間距離は  $30.5 \pm 1.6 \text{ \AA}$  であることがわかった。 $Ca^{2+}$  存在、非存在下で PELDOR 信号の周期が同じであることから、距離  $30.5 \text{ \AA}$  を示す信号は親和サイトに結合した  $Mn^{2+}$  由来であると裏付けられた。距離の分布が小さいことから、親和サイトに結合した  $Mn^{2+}$  は周囲のアミノ酸残基に強く結合し、位置が固定されていると予想される。酸素発生系内の  $Mn^{2+}$  の親和サイト候補となる金属原子位置と  $Y_D\cdot$  の原子位置、 $Y_D\cdot$  の電子密度分布を用いて PELDOR 信号を計算した (図 3)。Mn4 の原子位置に  $Mn^{2+}$  が結合すると仮定した場合のみ、信号の周期が実験値と一致した。さらに、酸素発生系近傍の任意の座標に範囲を拡張し、PELDOR 信号が実験値と一致する点を探った。その結果、実験値と一致する  $Mn^{2+}$  の座標は、 $Y_D\cdot$  を中心として Mn4 の位置を通過する球面上に分布した。Mn4 の位置は 2 つのアミノ酸残基 Asp170 と Glu333 が対角に配位するため、1 つのアミノ酸残基のみ配位する他の金属イオン位置に比べて強く結合位置が固定されると予想される。以上の結果から、光活性化反応過程の  $IM_0$  状態では、1 つの  $Mn^{2+}$  イオンが Asp170 と Glu333 の間にある親和サイトに結合し、2 つのカルボキシル基の C=O 部分の向きを決定すると考えられる。この  $Mn^{2+}$  イオンは光照射により  $Mn^{3+}$  に酸化され次の中間状態  $IM_1$  を形成し、 $Mn$  クラスターの原型になると予想される。

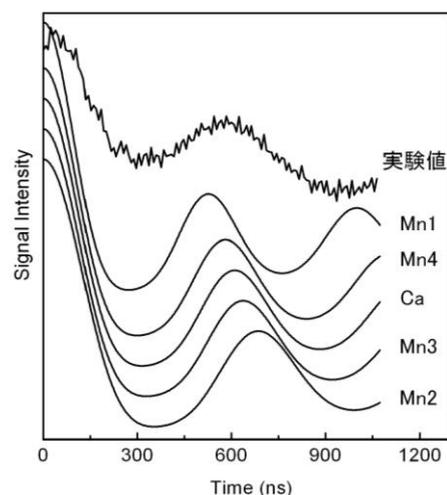


図 3  $Y_D\cdot$ - $Mn^{2+}$  間の PELDOR 測定と各原子位置を仮定した計算結果

## 2P096 ラマン分光法を用いた細胞内環境および細胞内分子の その場解析

(東北大薬<sup>1</sup>, 東北大院薬<sup>2</sup>) ○竹内 瑞貴<sup>1</sup>・堀井 湧介<sup>2</sup>・平松 弘嗣<sup>1,2</sup>・  
中林 孝和<sup>1,2</sup>

*In situ* observation of environments and molecules inside cells using Raman  
spectroscopy

(Tohoku Univ.) ○M. Takeuchi<sup>1</sup>・Y. Horii<sup>2</sup>・H. Hiramastu<sup>1,2</sup>・T. Nakabayashi<sup>1,2</sup>

**【序】** 各種外来刺激に対する細胞内環境の変化や細胞内にある生体分子の構造変化のその場観測を行うことを目指している。本発表では、ラマン分光法を用いた結果について報告する。ラマン分光法は、細胞内分子の構造情報を直接得ることができ、また分子間振動バンドの観測から、細胞内分子の分子間相互作用に関する知見を得ることができる。蛍光顕微観測では得ることが難しい分子の微小構造変化や細胞内環境変化の情報を得ることが期待される。さらに、細胞内分子を測定することで、ラベルフリーでの研究が可能であるなどの利点を持つ。

本研究では、深紫外共鳴ラマン分光法と低振動ラマン分光法の結果を中心に紹介する。励起光の波長と深紫外域にあるタンパク質のアミノ酸残基の吸収波長を一致(共鳴)させることによって、アミノ酸残基のラマン散乱強度を顕著に増加させることができる。細胞内測定においても、深紫外共鳴ラマン分光法は有効であり、細胞内にある生体分子のラマンスペクトルを高感度に測定することができる。細胞内分子の深紫外共鳴ラマンスペクトル変化から、外部摂動に対する細胞内の状態変化について様々な情報を得ることが期待される。

低波数領域の振動スペクトルの測定によって、主に分子間振動バンドを観測することができ<sup>1</sup>、近年テラヘルツ領域のスペクトルとして盛んに研究が行われている。細胞は分子クラウディングと呼ばれる無数の生体分子で高度に混み合っている状態であることが知られており、細胞内の低波数領域のラマンスペクトルを測定することによって、細胞内の分子クラウディング状態の外部摂動による変化を測定することを目的とした。

**【実験】** 深紫外共鳴ラマン測定では、光源にイントラキャビティのAr<sup>+</sup>レーザー(Coherent)を用い、芳香環を持つアミノ酸残基やヒスチジンが吸収する244と229 nmを励起波長とした<sup>2</sup>。低振動ラマン測定は、顕微ラマン分光装置(日本分光)を用いている。試料には人由来の細胞株であるHeLa細胞を用い、大量培養および遠心分離器で回収・洗浄した後、回転セルに導入し、深紫外共鳴ラマン測定を行った。低振動ラマンおよび非共鳴ラマンスペクトルの測定では、ディッシュ内で培養された状態で単一細胞レベルの測定を行った。

**【結果・考察】** <深紫外共鳴ラマン> Fig. 1に HeLa 細胞のラマンスペクトルについて、深紫外である 229 nm 励起光とした共鳴ラマンスペクトルと 488 nm を励起光とした非共鳴ラマンスペクトルを比較した結果を示す。非共鳴ラマンでは、脂質のバンドやタンパク質のアミドバンドが観測されるのに対し、229 nm 励起では、共鳴するトリプトファン(W)とチロシン(Y)のラマンバンドが選択的に観測されることがわかる。

深紫外共鳴ラマン散乱を用いた細胞内計測として、pH 依存性について検討した。HeLa 細胞を懸濁させる緩衝液の pH を変化させ、HeLa 細胞の深紫外ラマンスペクトルを測定した (Fig. 2)。各 pH で測定したスペクトルをチロシン Y9a のバンド強度で規格化した。pH の増加に従って、チロシンのラマン強度に対するトリプトファン (W) のラマン強度が増加することがわかる (Fig. 3)。トリプトファン残基のモデル化合物とチロシンの混合溶液の光退色の実験では、pH による相対強度の変化や光退色に差が見られないことから、相対強度の pH 依存性は、細胞内のトリプトファンの吸収の pH 変化を共鳴ラマンバンドの変化として観測していると考えられる。

<非共鳴ラマン> ガラスベースディッシュ上の HeLa.S3 細胞について、共焦点条件下で低振動ラマンスペクトルの測定を行った (Fig. 4)。主に水の分子間振動のラマンバンドが観測されている。細胞に焦点を合わせたときと周囲の培地 (水溶液) のラマン強度を比較すると、 $180\text{ cm}^{-1}$  付近のブロードなバンドが細胞内は細胞外と比べて強度が低くなっている。水を含めた細胞内分子の低振動ラマンスペクトルを観測しており、現在、細胞死などに伴う変化について検討している。

講演では他の波数領域の可視ラマンスペクトルを解析した結果およびポリエチレングリコール水溶液を用いて分子クラウディング状態を模倣した系と比較した結果について紹介する。

1. T. Nakabayashi, N. Nishi, J. Phys. Chem. A 106 (2002) 3491. 2. T. Fujimaki, K. Nishiya, T. Miura, T. Nakabayashi, submitted.

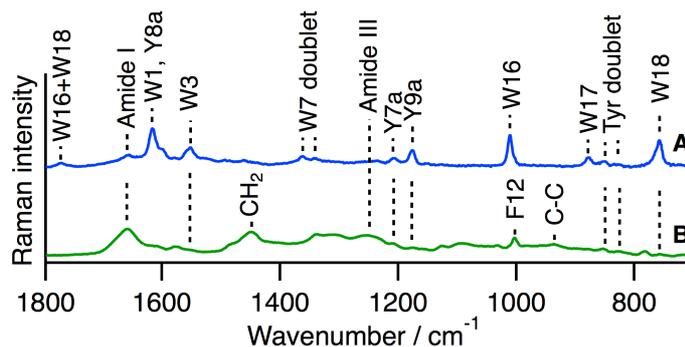


Fig. 1. HeLa 細胞の深紫外共鳴 (A, 229 nm 励起) および非共鳴 (B, 488 nm 励起) ラマンスペクトル

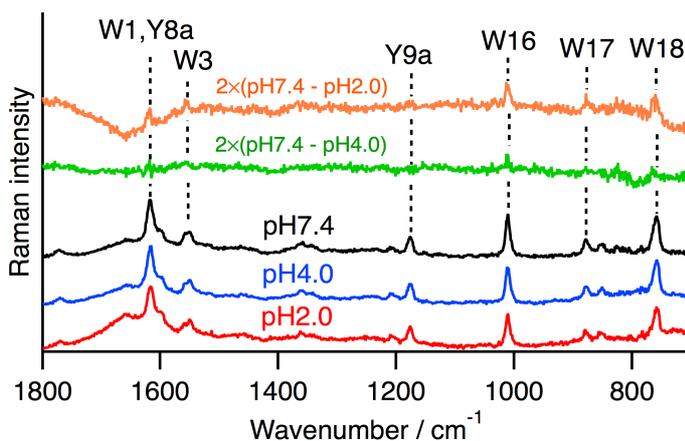


Fig. 2. HeLa 細胞の深紫外共鳴ラマンスペクトルの pH 依存性。各スペクトルは Y9a 強度で規格化している。異なる pH 間での差スペクトルを上 2 つに示す。

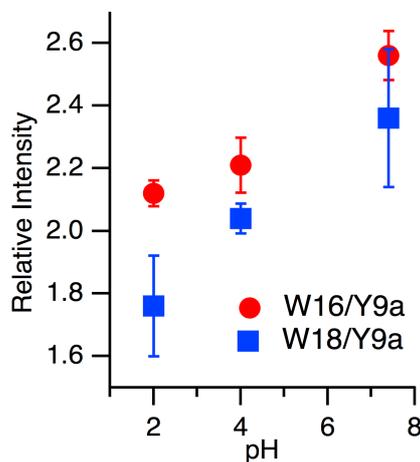


Fig. 3. Y9a に対する W16, W18 相対強度の pH 依存性

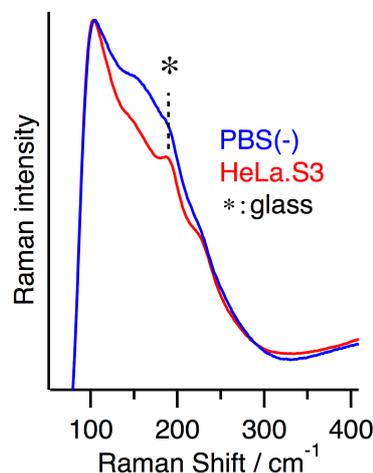


Fig. 4. HeLa.S3 細胞の低振動ラマンスペクトル。488 nm 励起。\* はガラスによる散乱。

2P097

## 時間分解 EPR 法を用いたヒトインスリンの 線維化によるドッキング構造変化の観測

(神戸大院理<sup>1</sup>・分子研<sup>2</sup>)

○安倍知花<sup>1</sup>, 立川貴士<sup>1</sup>, 茶谷絵理<sup>1</sup>, 森俊文<sup>2</sup>, 斉藤真司<sup>2</sup>, 小堀康博<sup>1</sup>

### Time-resolved EPR study on docking structure of human insulin undergoing fibrillation

(Kobe University<sup>1</sup>, Institute for Molecular Science<sup>2</sup>)

○Tomoka Abe<sup>1</sup>, Takashi Tachikawa<sup>1</sup>, Eri Chatani<sup>1</sup>, Toshifumi Mori<sup>2</sup>, Shinji Saito<sup>2</sup>, Yasuhiro Kobori<sup>1</sup>

#### 【序】

アミロイド線維はタンパク質の異常凝集体であり、アルツハイマー病等の原因物質であることが報告されている。この凝集体は複雑な巨大構造体であることから、アミノ酸残基の局所構造や線維形成機構など、未解明な部分が多い。本研究では、アミロイド線維化によるタンパク質の構造変化と電子伝達機能の関係性を明らかにすることを目的として時間分解電子スピン共鳴法(TREPR)による測定を行った。測定ではヒトインスリン(Figure 1b)をモデルタンパク質として用い、このインスリンに結合するリガンドとして、9,10-anthraquinone-1-sulfonate (AQ1S<sup>-</sup>)(Figure 1a)を用いた。リガンド-アミノ酸残基間の光誘起電子移動過程を低温条件下にて観測し、電荷分離状態での立体配置及びその電子的環境を線維化前後で比較することで線維化の影響を調べると共に、分子動力学計算によって詳細な結合位置とドッキング構造の安定性を推定した。

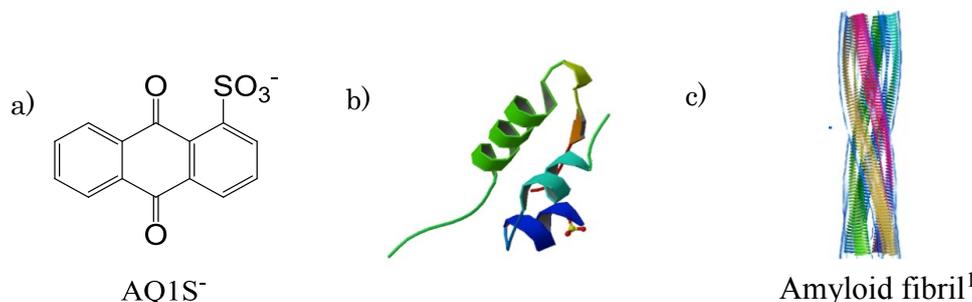


Figure 1. Structures of a) 9,10-Anthraquinone-1-sulfonate(AQ1S<sup>-</sup>), b) Human insulin and c) amyloid fibril

#### 【実験】

時間分解 EPR 計測：最終濃度がそれぞれ、インスリン 0.5 mM, AQ1S<sup>-</sup> 0.5 mM となるように酸性溶液 (25 mM HCl 水溶液 : glycerol = 1:1) に溶解させた後、Freeze-pump-thaw cycle にて冷却脱気を行った。線維化用にはインスリン溶液を 75°C で加熱し、チオフラビン T 蛍光を測定することで線維形成を確認した。時間分解 EPR の測定温度は 100 K とし、励起光源は Nd:YAG laser 第三高調波 (波長 355 nm, パルス幅 5 ns) を用いた。

分子動力学(MD)計算：インスリンの初期構造には X 線構造解析から得られている結晶構造を用いた。(PDBID:1GUJ) AQ1S<sup>-</sup>は Gaussian03 にて B3LYP/6-31G\*による構造最適化により得た。MD プログラムには Amber を用いた。AQ1S<sup>-</sup>の部分電荷を決定した後、インスリンとのドッキング構造を作成し、溶媒の影響も考慮してエネルギー最小化計算、加熱平衡化、npt、nvt 計算を行い系のトラジェクトリーを得た。

### 【結果と考察】

Figure 2 にレーザー照射後 800 ns におけるインスリン-AQ1S<sup>-</sup>複合体の TREPR スペクトルを示す。天然状態と線維状態の両者においてマイクロ波の放出を表す全放出(E)型のスペクトルを得た。

これらの信号は g 因子から AQ1S<sup>-</sup>とインスリン中のチロシン残基間のプロトン共役電子移動反応によって生成したラジカル対 (AQ1S<sup>2•-</sup>-TYR<sup>•</sup>) に同定された。三重項電子スピン分極移動モデル<sup>2</sup>

に基づいたシミュレーション解析結果を赤色で示している。Figure 2 の両スペクトルを比較すると、線維化後は 330 mT~340 mT にわたる線幅の大きな信号が消失し、さらに中心付近のシャープな信号成分の線幅が減少している。この線幅の減少はラジカル対の双極子間相互作用(D)が弱くなっていることを示しており、アミロイド線維化によってラジカル間距離が増加したことが分かる。解析により得られた D 値の値から、天然状態では 1.5 nm 程度のラジカル対間距離が得られ、チロシン残基から AQ1S<sup>-</sup>へとタンパク質主鎖を介した長距離電子移動反応が起きていると考えられる。線維化が起きるとインスリンのαヘリックス領域はβシート構造へと二次構造が変化するので、この構造変化がラジカル間距離の増大に寄与しているのではないかと考えられる。また交換相互作用の値から、線維化により電子的相互作用も減少することが明らかとなった。

さらに、インスリン天然状態における AQ1S<sup>-</sup>の結合位置を特定するため MD 計算を実行したところ、ValB18 や LeuB17 の疎水性領域に AQ1S<sup>-</sup>の芳香環が結合することが示され、上記のタンパク質主鎖を介する長距離電子移動を説明することができた。以上の結果および、NMR 法による測定結果から線維化前後の立体配置とリガンドの結合部位の変化について考察する。

### 【参考文献】

1. J. L. Jimenez et al, *PNAS*. **2002**, 99, 9196-9201
2. Y. Kobori et al, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 14621-14630.

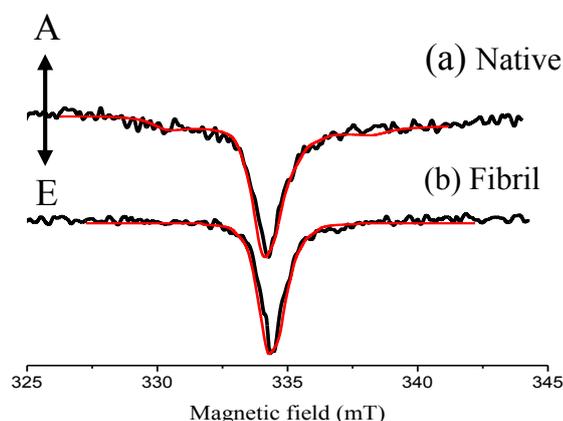


Figure 2. Time-resolved EPR spectra of native insulin-AQ1S<sup>-</sup> (a) and fibril insulin-AQ1S<sup>-</sup> at 800 ns after laser irradiation at 100 K.

## 2P098

### ハイブリッド輪帯波長板を用いた3次元超解像顕微鏡

(オリンパス(株)<sup>1</sup>、北里大学<sup>2</sup>、ブダペスト経済工科大学<sup>3</sup>)

○池滝 慶記<sup>1, 2</sup>、熊谷 寛<sup>2</sup>、ヤン カレル<sup>3</sup>、ナンドール ボコル<sup>3</sup>

### Three dementional super-resolution microscopy using annular hybrid wave plate

(Olympus1, Kitasato University, Budapest University of Technology and Economics)

○Yoshinori Iketaki, Hiroshi Kumagai, Jahn Kornel, Nandor Bokor

#### 【序】

2波長蛍光分光法と波面制御光学を用いた超解像顕微鏡法では、第1のレーザー光(ポンプ光)で色素分子を $S_1$ 状態に励起した後、更に第2のレーザー光(イレース光)で $S_1$ 分子を照明する。このとき、誘導放出や誘導吸収が起こり、 $S_1$ 分子のポピュレーションが減少するので、結果的に分子からの蛍光を抑制することができる(図1)。もし、タイトな中空形状のスポットもつイレース光をポンプ光と共に試料上に集光すれば、ポンプ光辺縁分で蛍光抑制効果が誘導できるので、ポンプ光の集光サイズよりも微細な蛍光スポットが得られる。このスポットにより試料を空間走査すれば、回折限界を陵駕する空間分解で試料を蛍光観察ができる<sup>1)</sup>。この考えを拡張すると、蛍光スポットを焦点面内のみならず深さ方向にも微細化できる。この場合には、焦点面近傍において3次的に光の当たらない微小領域、すなわち3次元ダークスポットをもつイレース光を用いる。3次元ダークホールを具体的に生成する方法として、ディストラクティブな干渉法を用いることができる。例えば、輪帯中央領域で位相が反転する波面分布をもつイレース光ビームをすると、焦点とそのごく近傍において、電場を3次的に相殺できる。ガウシアン状のポンプ光と共に調整して集光すれば、蛍光スポットは3次的に回折限界以下のサイズに収縮する。<sup>2)</sup>本研究では、これを実現できる3次元超解像顕微鏡用2波長ハイブリッド輪帯波長板を作製した。

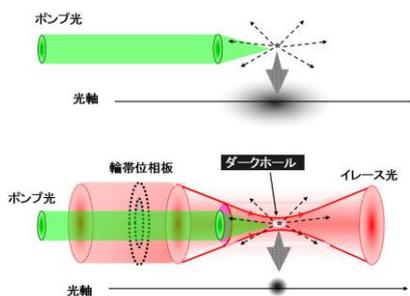


図1：3次元超解像顕微鏡法の原理

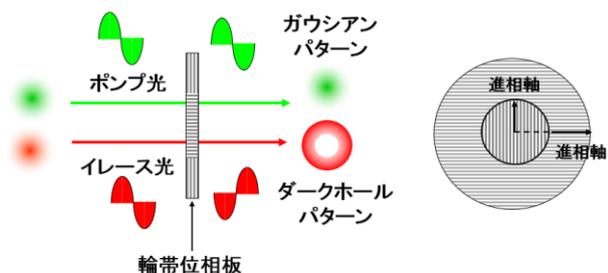


図2：ハイブリッド輪帯波長板の構造と機能

#### 【ハイブリッド輪帯波長板を用いた超解像顕微鏡装置】

ハイブリッド輪帯波長板は、2枚の水晶のマルチオーダーの波長板を組合せて作製する。これを市販のレーザー走査顕微鏡の照明光学系に挿入することで、3次元超解像顕微鏡システムを構築した。この波長板は、図2に示す様に同じ厚みの円柱状と輪帯の水晶板をお互いの進相軸を直交させて紫外線硬化性樹脂により接合したものである。イレース光に対して $\lambda/2$ 波長板として機能し、ポンプ光に対しては $\lambda$ 波長板として機能する様に、一体で光学研磨してこの基板の厚みを調整する。直線偏光したイレース光が外輪基板を通過すると、内輪基板を通

過したイレース光に対して位相が反転する。それに対して、ポンプ光は基板のどの部分を通過しても波面は全く影響を受けない。その結果として、イレース光のみが焦点近傍でディストラクティブな干渉を起こし、ダークスポットが生成される。我々は、Nd:YAG レーザーの2倍波( $\lambda=532\text{nm}$ )をポンプ光とし、Kr レーザー ( $\lambda=647\text{ nm}$ ) をイレース光とした場合の波長板を作製し、こその超解像機能を確認した。これをレーザー走査顕微鏡 (Fluoview 1000) に挿入し、試料ステージを移動させながら、ポンプ光とイレース光を同軸で空間走査して3次元的な超解像顕微鏡画像を得る。

### 【評価実験】

作製した波長板のビーム整形機能を確認するために、ポンプ光照射でもイレース光照射でも発光する蛍光ビーズ像を空間計測した。用いた蛍光ビーズ (Molecular Probe: F8806) は回折限界よりも小さいので、得られた蛍光像は焦点近傍領域におけるそれぞれの集光ビームの空間形状に対応する。図3は、開口数 1.3 の対物レンズでこれらのビームの集光したときの空間形状を示す。ポンプ光は通常のガウシアンビームとして集光しているが (a)、イレース光は焦点近傍において3次元的な中空構造を有しており、超解像顕微鏡観察に不可欠なダークホールが生成できていることが分かる (b)。この照明条件下で、波長 647nm のイレース光で蛍光抑制できるナイルレッドを分散した蛍光ビーズ (平均粒径: 60 nm) を3次元的に空間走査して、蛍光ビーズを超解像顕微鏡観察した。図4 (a) は、ポンプ光のみで通常の蛍光顕微鏡観察 (通常観察) を行った時の単一のビーズの蛍光像を示す。蛍光ビーズのサイズはポンプ光の回折限界 (240 nm) よりも十分小さいので、得られた蛍光像は顕微鏡システムが提供できる点像分布関数に対応する。波動光学理論が示す様に、その3次元形状は光軸方向に広がった回折限界サイズの回転楕円体になっている。一方、(b) はピーク強度 30mW のイレース光を同時に照射したときの3次元超解像顕微鏡画像である。それによれば、蛍光像が平面方向のみならず光軸方向にも回折限界以下に収縮していることが分かる。詳細な実験結果は講演にて報告する。

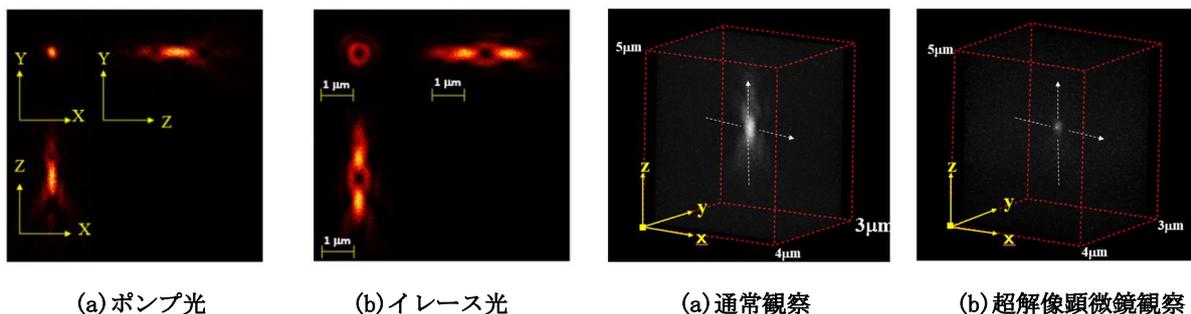


図3 : ハイブリッド輪帯波長板の機能確認

図4 : 3次元超解像顕微鏡観察の実例 (60nm 蛍光ビーズ)

- 1) Y. Iketaki, T. Omatsu, O. Sato, T. Suzuki, M. Fujii, Trends in Optics and Photonics OSA Proceedings Series (TOPS), 39 (2000) 167.
- 2) Y. Iketaki, H. Kumagai, K. Jahn, N. Bokor, Opt. Lett. 40 (2015) 1057.

## 2P099

### 近赤外波長可変レーザーを用いたクライオ 1 分子蛍光顕微鏡の作製 (東工大 物理) ○田邊 大明・資延 啓・藤芳 暁・松下 道雄

Single-molecule cryo-fluorescence microscope with near-infrared tunable laser light.

(Department of Physics, Tokyo Institute of Technology) ○Hiroaki Tabe, Kei Sukenobe,

Satoru Fujiyoshi & Michio Matsushita

【序】 蛍光顕微鏡は化学・生物学・医学などの広い分野において重要な手法である。例えば、その応用として、細胞中の狙ったタンパク質に蛍光色素や蛍光タンパク質を特異的に標識し、その蛍光を検出することで細胞の内部構造を可視化することができる。しかし、光の回折現象により、蛍光顕微鏡の分解能は分子レベルに達していない。生命現象のような複雑系を正確に理解するには分子の分布やその相互作用を分子レベルで観察することが重要である。このような観察に有望なのがクライオ蛍光顕微鏡であると考えている。この方法では既に 7 nm の分解能 (半値全幅) が達成されている[1]。この分解能は室温での実験と比べて 1 桁高い。この実験では非極性分子 (n-tetradecane) 結晶中の色素 (DBATT) を用いて観察を行った。極低温において、DBATT 分子の吸収スペクトル幅は 25-60 MHz と、不均一幅~600 GHz に比べて 4 桁細くなる。この系に対して、十分に線幅の細いレーザー光で蛍光励起スペクトルを測定すると、個々の DBATT 分子がスペクトルラインとして観測される。このようなスペクトル分解によって、個々の分子を見分け、超解像画像を得ている。しかし、細胞中では極性環境が大きく異なり、DBATT 分子を細胞観察にそのまま用いても、同じようにスペクトル分解できない。そのため、我々はスペクトル分解によるクライオ超解像イメージングに適した蛍光色素を探すために近赤外波長可変レーザーを用いたクライオ蛍光顕微鏡を開発したので報告する。

【実験】 波長可変レーザー 作製した波長可変レーザーの光学系を図 1 に示す。光源はチタンサファイアレーザー (波長 800 nm、パルス幅 100 fs) を用いた。1/2 波長板と偏光子で強度を調整した後、レンズ L1 (f=9 mm) で 500 mW のレーザー光をフォトニック結晶ファイバーにカップルした。出力したスーパーコンテニューム光をレンズ L2 (f=9 mm) でコリメートした後、2 枚のレンズ (L3: f=-100 mm, L4: f=500 mm) によってビーム径を 5 倍拡大し、プリズムで分光した。この時のビーム直径 (1/e<sup>2</sup>幅) は 17 mm であり、このビーム直径が最終的な出力光のスペクトル幅を決める。プリズムから出た光のビーム径を 2 枚のレンズ (L5: f=400 mm, L6: f=-50 mm) で小さくし、レンズ L7 (f=9 mm) でシングルモードファイバーにカップルした。L6 と L7 の間にある 2 枚の平面ミラー M3, M4 はカップル効率を調整するためである。レンズ L6, L7 と平面ミラー M3, M4 とシングルモードファイバーは電動ステージの上に乗っていて、紙面上下方向に移動させることで任意の波長の光をシングルモードファイバーにカップルすることができる。図 2(a) に波長可変レーザーのスペクトルを示す。中心波長は 664.1 nm、スペクトル幅 (半値全幅: FWHM) は 0.27 nm であった。また、図 2(b) に各波長におけるスペクトルの FWHM と光強度を示す。図のように 500~700 nm において、FWHM が 0.3 nm 以下であり、光強

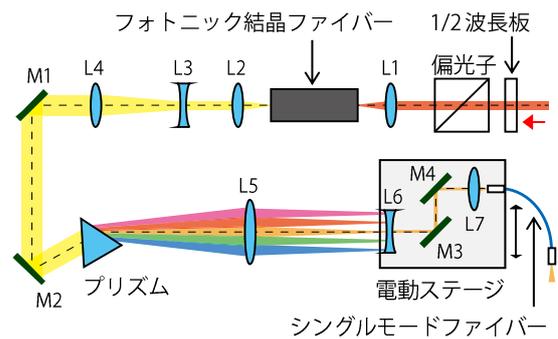


図 1: 作製した波長可変レーザー

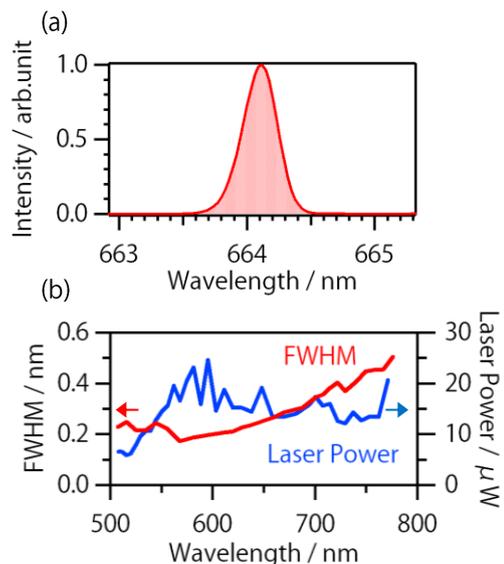


図 2: 作製した波長可変レーザーのスペクトル(a)及び波長幅 (FWHM) と光強度(b)

度が 10~20  $\mu\text{W}$  であった。

**クライオ蛍光顕微鏡** 作製したファイバー入力型のクライオ共焦点蛍光顕微鏡の光学系を図3に示す。シングルモードファイバーから出力した波長可変光をビームスプリッターで反射させ、球面鏡CM1 ( $f=500\text{ mm}$ ) でピンホールを通過させ、球面鏡CM2 ( $f=500\text{ mm}$ ) でコリメートした。2枚の球面鏡CM3,CM4 ( $f=250\text{ mm}$ ) はレーザー走査機構のために設置しており、電動ステージの上に乗ったCM3を移動させることでサンプル上で光の焦点を2次元に空間走査できる[2]。サンプルからの蛍光は励起光の逆経路を通り、ビームスプリッターを通過してアバランシェ・フォトダイオード (APD) で検出した。図の中央にあるピンホール (直径:  $300\text{ }\mu\text{m}$ ) は光源のピンホール兼、検出のピンホールであり、有無は電動ステージによって切り替え可能である。作製したクライオ顕微鏡は球面鏡を用いた反射型であるため色差差がゼロであり、ファイバー入力型であるため様々なレーザー光を使用できる。反射型の対物レンズには焦点距離が  $2\text{ mm}$ 、開口数が  $0.6$  のものを用いた。

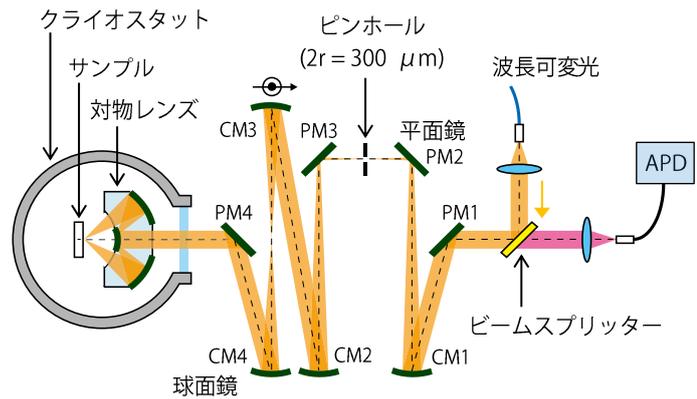


図3：作製したファイバー入力型クライオ共焦点蛍光顕微鏡

【結果】作製したクライオ蛍光顕微鏡の性能を確認するため、Alexa Fluor 750 (以下、Alexa750) の室温 ( $296\text{ K}$ ) における1分子蛍光イメージを行った。試料には濃度  $90\text{ pM}$  とした Alexa750 緩衝溶液のスピコート膜を用いた。膜厚を均一にするためにポリビニルアルコール1%を混ぜた。励起光には半導体レーザー (OBIS685、波長  $685\text{ nm}$ ) を用いた。図4(a)に  $30\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ }\mu\text{m}$  の範囲で測定したピンホールありの1分子蛍光イメージを示す。個々の Alexa750 が個々の輝点として、1分子ずつ約50個観測された。また、ピンホールの有無による1分子蛍光イメージの違いを図4(b),(c)に示す。2つの図を比較すると、ピンホールを用いることで、反射対物レンズに特有の強いエアリーリングが小さくなり、中心のエアリーディスク幅も小さくなっている。今後、波長可変レーザーと顕微鏡を組み合わせ、超流動液体ヘリウム温度で単一分子状態での蛍光色素の発光励起スペクトルを測定し、クライオ超解像に適したの色素の検討を行う。

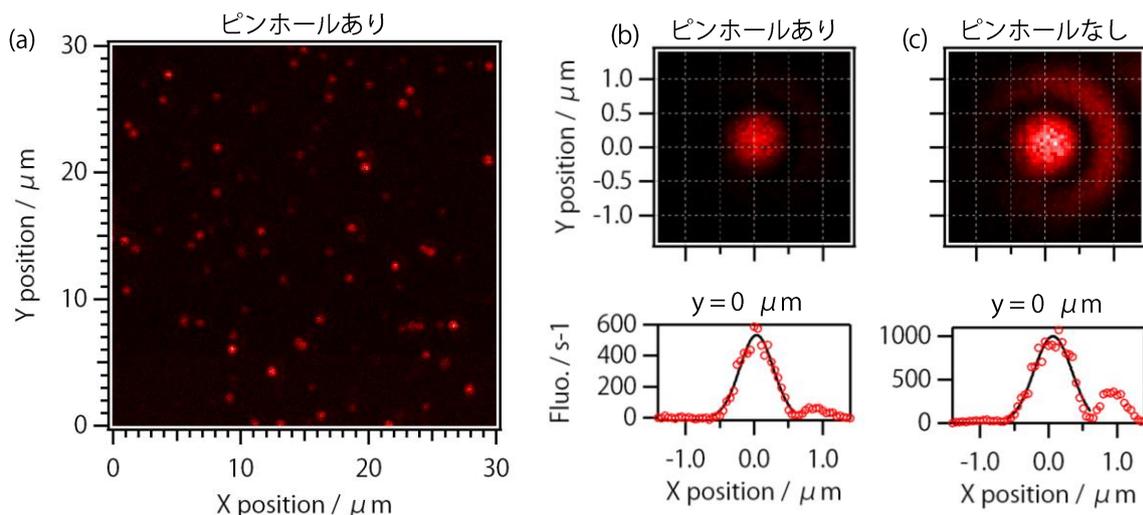


図4：室温 ( $296\text{ K}$ ) における Alexa750 のピンホールありの蛍光イメージ(a)とピンホールあり(b)及びピンホールなし(c)の1分子の蛍光イメージと  $y=0\text{ }\mu\text{m}$  における断面強度分布。

【参考文献】

[1]A.BLOEB et al. ; *Journal of Microscopy*, **205**, 76-85 (2002)  
 [2]S.Fujiyoshi et al. ; *Phys. Rev. Lett.*, **106**, 078101 (2011)