

3P081

大気圧非熱平衡プラズマ照射による チオラート保護金クラスターの構造変化

(東大院理¹, 京大ESICB²)

○江守 宗次郎¹, 高野 慎二郎¹, 山添 誠司^{1,2}, 小安 喜一郎^{1,2}, 佃 達哉^{1,2}

Structural change of thiolate protected gold cluster by atmospheric pressure non-equilibrium plasma

(Sch. of Sci., The Univ. of Tokyo¹, ESICB, Kyoto Univ.²)

○Sojiro Emori,¹ Shinjiro Takano,¹ Seiji Yamazoe,^{1,2} Kiichirou Koyasu,^{1,2} Tatsuya Tsukuda^{1,2}

【序】チオラートなどの有機配位子で保護された金クラスターは、安定化学種としてサイズ選択的に合成することができる。この配位子を部分的に除去することにより、高性能触媒[1]や異方的な構造体・融合体の創出につながるものと期待される。これまで配位子の除去法としては、加熱による物理的方法[1]やルイス酸処理による化学的方法[2]が報告されている。我々は新しい配位子除去法として、大気圧非熱平衡プラズマ (atmospheric pressure non-equilibrium plasma; APNP[3]) に着目した。APNP は、燃料ガスや雰囲気ガス由来のイオン種や準安定励起種などを発生する簡便な方法であり、金属の表面洗浄、有害ガスの分解など様々な分野で応用されている。本研究では4-ピリジルエタンチオール保護金クラスター $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ を例として取り上げ、APNP 照射による構造変化を追跡した。

【実験】塩化金酸水溶液に臭化テトラブチルアンモニウム (TBA-Br)、4-ピリジルエタンチオール塩酸塩 (PyET·HCl) を混合し、過剰量の水素化ホウ素ナトリウムによって還元したのちに精製することで、ピリジルエタンチオール保護金クラスター $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^- \cdot \text{TBA}$ を得た。

作成した APNP 発生装置は、燃料ガスを流通させるガラス管 (内径 2 mm、外径 3 mm) とその外周に取り付けた 2 つの円筒状の電極で構成されている (図 1a)。ガラス管内部に燃料ガスとしてヘリウムガスを 0.1–1.0 L/min の流量で流しながら、外部電極間に交流電圧 (ピーク間電圧 V_{p-p} 14 kV、周波数 8 kHz) を印加することで APNP を発生させた (図 1b)。APNP 中に発生した活性種を、発光分光法によって同定した。

さらに、メタノールに分散させた $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^- \cdot \text{TBA}$ に対して APNP を照射しながら、その経時変化を紫外可視近赤外吸光分光法によって追跡した。生成物を MALDI 質量分析、Au L_3 端 EXAFS 解析 (測定温度: 10 K) によって評価した。

【結果と考察】APNP 中の活性種を発光分光によって調べたところ、ヘリウムや大気中の窒素、酸素などに由来する He^* 、 N_2^+ 、O などのイオン種や中性励起種が観測さ

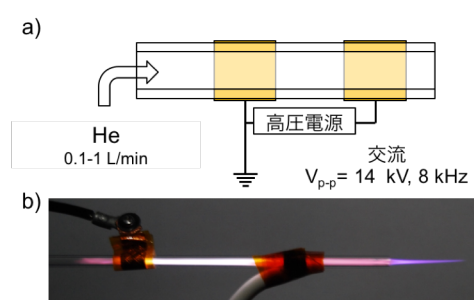


図 1. APNP の(a)発生装置と(b)発生の様子.

れた。APNP を照射することで、これらの活性種や、これらの活性種と空气中・溶液中の分子との反応によって生成する化学種がクラスターに作用するものと考えられる[3]。

APNP 照射前の吸収スペクトル(図2 黒線)から、正二十面体の Au_{13} をコアとする $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ の生成が確認された。APNP 照射後の分散液の吸光スペクトルの変化を図2に示す。APNP 照射開始 90 秒程度で $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ に特徴的な 780 nm 付近の肩構造が消失したことから、 $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ へと酸化されたことがわかった。その後は APNP 照射時間とともに $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ に特徴的な 400、445、680 nm の吸光ピークが徐々に消失していくことから $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ がさらに分解が進行したと考えられる。APNP 照射時間が 450 秒を超えると、新たに 850 nm 付近に吸収ピークが出現した。これまでに報告例のない吸収スペクトルが得られたことから、通常の湿式合成では得られない新しいクラスターが生成したことが示唆された。

APNP 照射前後の負イオンの MALDI 質量スペクトルを図3に示す。照射前には $m/z = 7410$ に $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ のピークのみが見られたが、照射後には新たに $m/z \approx 5900$ にピークが観測された。質量数が大きく減少していることから、APNP 照射によってクラスターの解離が誘起されたものと考えられる。しかし、この質量数は $\text{Au}_M(\text{PyET})_M$ のどの組成でも説明できなかった。現在までに一義的な組成の決定には至っていないが、 $\text{Au}_{23}(\text{PyET})_9\text{S}_4$ ($m/z \approx 5902$) などが候補としてあげられる。

APNP 照射前後の Au L_3 端 X 線吸収振動パターンを比較したところ、照射後の試料では高波数領域において fcc 構造の Au コアをもつ $\text{Au}_{23}(\text{SR})_{16}$ [4]と酷似した振動パターンが観測された。この結果は、APNP 照射によって Au コア構造が正二十面体から fcc 構造へと変化したことを示唆している。

以上のように、チオラート保護金クラスター $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ に APNP を照射することによって、解離や構造変形を経て、通常の合成では得られない新奇クラスターが得られることが明らかになった。

【参考文献】

- [1] Yoskamtorn, T. *et al.* *ACS Catal.* **2014**, *4*, 3696. [2] Li, G. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14295. [3] Olenici-Craciunescu, S. B. *et al.* *Spectrochim. Acta B*, **2009**, *64*, 1253. [4] Das, A. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 18264.

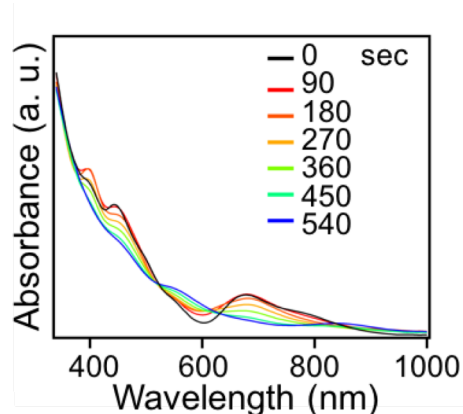


図2. APNP 照射中における $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ 分散液の紫外可視近赤外吸収スペクトル。

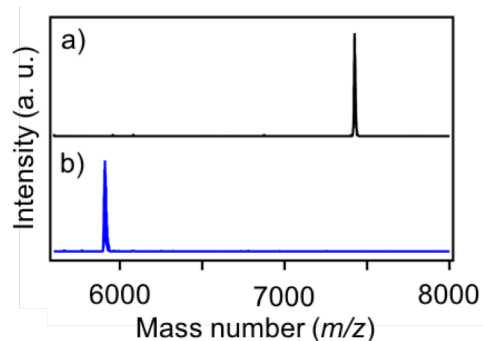


図3. APNP 照射(a)前、(b)後の $\text{Au}_{25}(\text{PyET})_{18}^-$ の負イオン MALDI 質量スペクトル。

3P082

CdSe-Pt ハイブリットナノ構造体の二段合成と 電子移動ダイナミクスの研究

(関西学院大院・理工) ○前田錦吾, 奥畑智樹, 片山哲郎, 玉井尚登

Two-step Synthesis and Electron Transfer Dynamics of CdSe-Pt Hybrid Nanostructures

(Kwansei Gakuin Univ.) ○Kingo Maeda, Tomoki Okuhata, Tetsuro Katayama,
Naoto Tamai

【序】コロイド合成法により合成された半導体ナノ材料に金属ナノ粒子 (NPs) を接合させたハイブリットナノ構造体 (HNs) では, 高効率な電荷分離が期待される。その為に, 近年光触媒や太陽光発電への応用が注目され, HNs の合成や光物性に関する研究が行われている。例えば, PbS 量子ドットの HNs において, 超高速キャリア移動 ($\ll 100$ fs) とピコ秒スケールのキャリア移動が観測された [1]。我々も今までに CdSe ナノプレート (NPLs) の端に Pt NPs が付いた CdSe-Pt HNs を合成し, 過渡吸収分光を行うことで, 速いダイナミクスを観測した。しかし, NPLs に接合させる金属 NPs のサイズ依存性や励起波長依存性についてはまだ報告されていない。本研究では, HNs の合成において低温で Pt 前駆体溶液と CdSe NPLs 溶液を反応させ, その溶液に Pt 前駆体溶液をさらに加えて高温で反応させた。この方法を用いることで, Pt NPs のサイズを今まで合成してきた HNs よりも大きくすることを目指した。この試料に関して走査型透過電子顕微鏡 (STEM) で構造解析すると共に, フェムト秒過渡吸収分光により電子移動ダイナミクスを解析したので報告する。

【実験】CdSe NPLs は窒素雰囲気下, ミリスチン酸カドミウム, Se 粉末およびオクタデセンの加熱混合溶液に酢酸カドミウムを注入することで合成した [2]。合成した CdSe NPLs と Pt 前駆体を合わせた混合溶液を低温 (~ 100 °C) で反応させた。これを一段階目とし, この溶液を用いて CdSe NRs に Pt NPs を接合させた合成法 [3] を参考にした高温での二段階目の合成を行った。これらの試料に関して吸収スペクトル, 発光スペクトルを測定すると共に, 励起光にフェムト秒 Ti:Sapphire レーザーを, 観測光にはフェムト秒白色光を用いて過渡吸収分光測定を行った。また, 過渡吸収スペクトルの励起波長依存性を解析した。

【結果と考察】STEM 像の結果 (図 1) から, CdSe NPLs のサイズは Pt の接合に伴い形状が変化しているものも観測された。しかし, 吸収スペクトル (図 2) において CdSe NPLs のピークに変化がないことから厚み方向の変化が

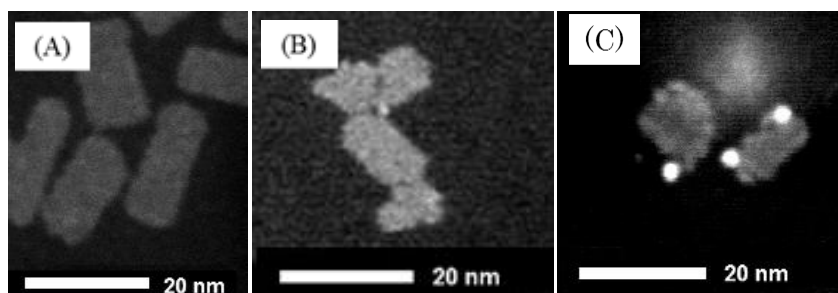


図 1. CdSe NPLs (A), 低温による一段階目の合成 (B) および高温による二段階目の合成 (C) の STEM 像

なく、1次元量子閉じ込めが強く効いていることが観測できた。二段階目の合成結果の STEM 像 (c) では Pt NPs と思われるコントラストの高い粒子が観測され、その平均サイズは (1.8 ± 0.5) nm であったことから、一段合成よりサイズが少し大きいものが NPLs に接合してきていることが確認できた。また、発光スペクトル (図 2) において一段階目では CdSe NPLs ($\Phi_f = 0.27$) だけのものより $\sim 72\%$ 消光し ($\Phi_f = 0.06$)、二段階目では 99% 以上が消光した ($\Phi_f < 10^{-4}$)。

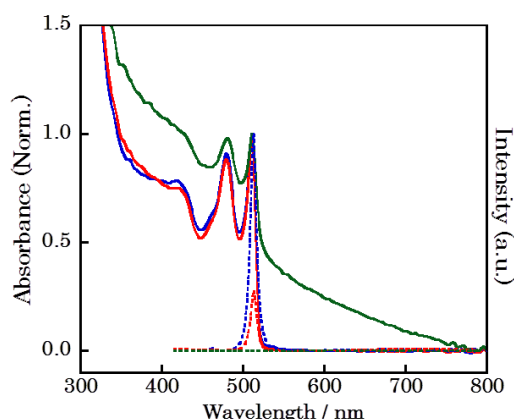


図 2. CdSe NPLs (青)、一段階目 (赤) および二段階目 CdSe-Pt HNs (緑) の吸収スペクトル (実線) と発光スペクトル (点線)

一段合成によって得られた CdSe-Pt HNs (Pt NPs の粒径 ~ 1.5 nm) において OPA を用いて 400 nm、510 nm および 570 nm 励起のフェムト秒過渡吸収を行った。各励起波長での heavy-hole におけるダイナミクスにおいて、速い減衰成分が励起モードにかかわらず存在していることがわかる (図 3)。この速い減衰は CdSe NPLs のバンド端から Pt NPs への電子移動であると考えられる。400 nm 励起におけるダイナミクスの立ち上がりが

510 nm 励起とほぼ同じであるが、時間分解能の観点から高励起状態からのホット電子移動に関する議論は難しい。しかし、Pt 接合によって、400 nm と 510 nm 励起のどちらにおいても heavy-hole のブリーチ吸収が小さくなっていることから (図 4)、パルス応答関数よりも非常に速い電子移動が生じていると考えられる。また、Pt NPs の LSPR バンドの裾を励起しても CdSe NPLs の heavy-hole

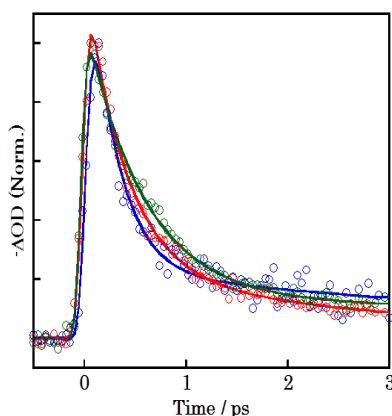


図 3. 400 nm (青)、510 nm (赤) および 570 nm (緑) 励起で観測した heavy-hole ブリーチバンドの CdSe-Pt HNs の過渡吸収ダイナミクス

のブリーチがパルス幅で立ち上がり、他の励起波長とほぼ同じ減衰時間であることから、Pt NPs と CdSe NPLs は強くカップリングしていると考えられる。

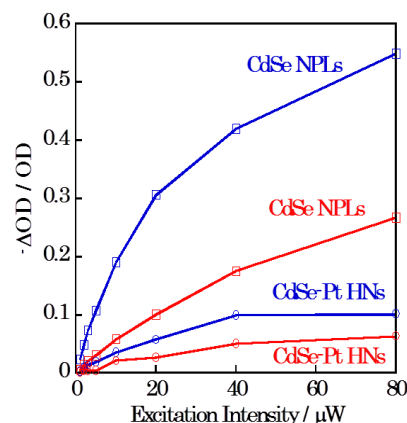


図 4. 400 nm (青)、510 nm (赤) 励起で観測した heavy-hole ブリーチバンドにおけるブリーチ収率

- [1] T. Okuhata, Y. Kobayashi, Y. Nonoguchi, T. Kawai, N. Tamai, *J. Phys. Chem. C.*, **2015**, *119*, 2113-2120.
- [2] M. Pelton, S. Ithurria, R. D. Schaller, D. S. Dolzhenkov, D. V. Talapin, *Nano Lett.*, **2012**, *12*, 6158-6163.
- [3] P. Yu, X. Wen, Y. C. Lee, W. C. Lee, C. C. Kang, J. Tang, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2013**, *4*, 3596-3601.

CdSe ナノ粒子の光物性に及ぼす光化学電子ドーピング効果

(関学大院・理工) ○柿本直樹, 片山哲郎, 玉井尚登

Photochemical electronic doping effects on photophysical properties of cadmium selenide nanoparticles

(Kwansei Gakuin Univ.) ○Naoki Kakimoto, Tetsuro Katayama, Naoto Tamai

【序】半導体ナノ粒子において、多励起子状態からのオージェ再結合による無輻射緩和が応用時の効率を低下させる可能性があることは広く研究されている。一方で、単一分子分光において、オージェイオン化が発生した後、生成した電荷と新たな励起子が相互作用し、準粒子トリオンが形成されることが報告されているが[1]、電荷をもった半導体ナノ粒子の光物性や、トリオンの光学的・物理的性質、およびそのオージェ再結合についてはいまだ研究例が少ない。電荷をもった半導体ナノ粒子を溶液中で作成する方法の一つとして、光化学電子ドーピング法が報告されている[2]。本研究では、セレン化カドミウムの量子ドットとナノプレートレットをそれぞれ合成し、これに対して正孔捕捉剤を用いて光化学電子ドーピングを行い、励起子から正孔を奪い負に荷電した半導体ナノ粒子を作製すると共に、その光物性を評価した。

【実験】コロイド合成法として広く用いられているホットインジェクション法を用いて CdSe ナノ粒子を合成した。CdSe 量子ドットは、トリオクチルホスフィン配位子としてカドミウム前駆体をアルゴン雰囲気中で加熱し、そこにセレン前駆体を注入し合成した後、トルエンに分散させた。CdSe ナノプレートレットは、カドミウム前駆体とセレン前駆体を窒素雰囲気中で混合加熱したところに酢酸カドミウムを注入して合成し、オレイン酸を配位子としてトルエンに分散させた。光化学電子ドーピングは、窒素雰囲気中で脱水脱酸素トルエン中で正孔捕捉剤として LiEt_3BH の THF 溶液を半導体ナノ粒子溶液に加え、光励起することによって還元反応を進行させた。電荷を付与された半導体ナノ粒子は酸素に曝露されることで酸化され、中性状態に戻ることが報告されている[2]。これを確認する為に、光化学電子ドーピングを行った後、サンプル溶液に対して酸素バブリングを行い酸化を進行させた。これらの過程を可視吸収・発光スペクトルで測定した。また、

Ti:Sapphire laser の基本波を BBO に通して発生させた第二高調波 ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$) を励起

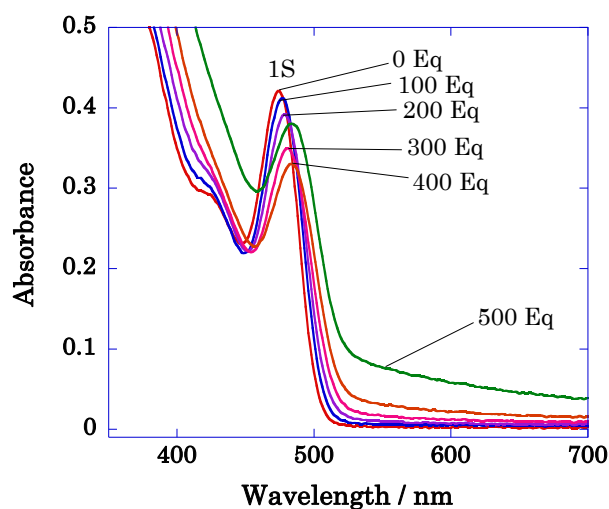


図 1. CdSe 量子ドットに対するトルエン溶液中の正孔捕捉剤の等量とそれによる吸収スペクトルの変化

光に用いた時間分解蛍光分光, およびフェムト秒過渡吸収分光を用いた測定も行った。

【結果と考察】 CdSe 量子ドットに対して 100 等量から 200 等量程度の少量の正孔捕捉剤を加えた場合, 吸収スペクトルにわずかな変化しか見られなかったのに対して発光スペクトルにおいては蛍光量子収率が最大で 5 倍になるなど著しい発光増強が観測された(図 2)。さらに正孔捕捉剤の添加量を増やすにつれて消光が見られ, 蛍光量子収率が減少すると共に励起子吸収ピークのレッドシフトとブリーチングが観測された(図 1)。その後サンプルを空気に曝すと, ブリーチングは回復したもののピークシフトは完全には回復せず発光は再度増強された。一方で, 最も大きな発光増強が見られた粒径 2.3 nm の小さな量子ドットと比較して欠陥発光がほとんど観測されなかった粒径 3.6 nm の大きな量子ドットでは, 比較的小さな発光増強しか見られなかった。CdSe ナノプレートレットにおいては, 吸収・発光ピークの大きなシフトが観測された。一方でその TEM 像に大きな変化がなかったことから, 何らかの電子状態の変化が起こっていると考えられる。これらの負に荷電した CdSe ナノ粒子にみられた発光増強メカニズムの解明を, 時間分解蛍光分光法, およびフェムト秒過渡吸収分光を用いた測定によって試みたので報告する。

【参考文献】

- [1] Mark J. Fernée, Bradley N. Littleton and Halina Rubinsztein-Dunlop, *ACS Nano*, **2009**, 3, 3762–3768.
- [2] Jeffrey D. Rinehart, Alina M. Schimpf, Amanda L. Weaver, Alicia W. Cohn, and Daniel R. Gamelin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 18782–18785.
- [3] Celeste A. Constantine, Kerim M. Gattás-Asfura, Sarita V. Mello, Gema Crespo, Vipin Rastogi, Tu-Chen Cheng, Joseph J. DeFrank, and Roger M. Leblanc, *Langmuir*, **2003**, 19, 9863–9867.
- [4] M. Pelton, S. Ithurria, Richard D. Schaller, Dmitriy S. Dolzhenkov, Domitri V. Talapin, *NanoLett.* **2012**, 12, 6158–6163.

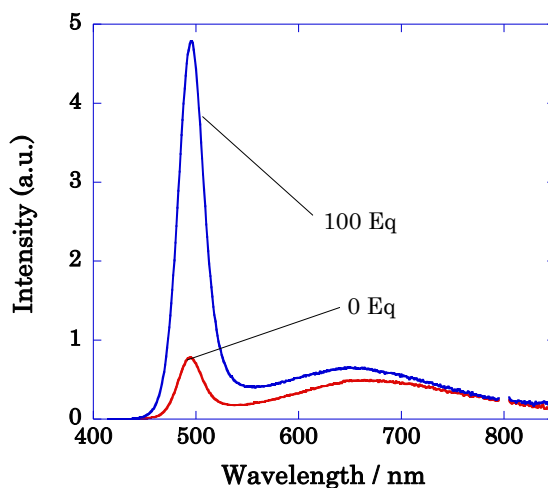


図 2. CdSe 量子ドットに対するトルエン溶液中の正孔捕捉剤の等量とそれによる発光スペクトルの増強

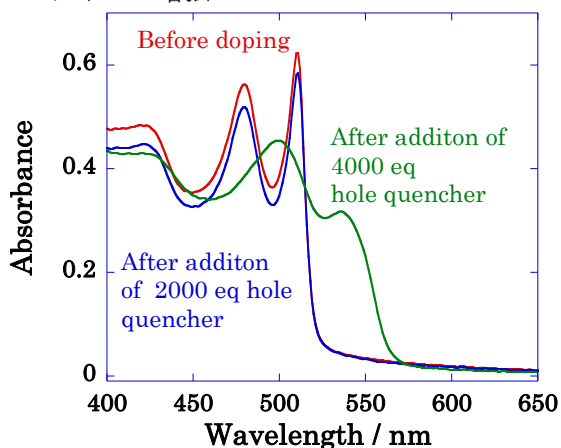


図 3. CdSe ナノプレートレットに対するトルエン溶液中の正孔捕捉剤の等量とそれによる吸収スペクトルの増強

液中パルスレーザー照射によるフッ素化銅フタロシアニン ナノロッドの作製

(愛媛大学院理工¹, 奈良先端大 物質²)○木原諒¹, 今田修輔¹, 河合壯², 朝日剛¹

Fabrication of Cu-hexadecafluorophthalocyanine nanorods by ns pulsed laser irradiation in liquids

(Ehime Univ.¹, Nara Inst.Sci.Tech.²)○Ryo Kihara¹, Shusuke Imada¹, Tsuyoshi Kawai²,
Tsuyoshi Asahi¹

[序]我々はこれまで液中レーザーアブレーション法によって様々な有機微結晶のナノ粒子を作製し、報告してきた^[1]。この手法は、貧溶媒中に分散させた原料微結晶に高強度パルスレーザーを照射することによって微結晶を粉砕し、ナノ粒子を得る方法である。最近では、アブレーションにより有機溶媒中で銅フタロシアニン(CuPc)ナノロッドを作製したこと報告した。本研究では、図1に示すフッ素化銅フタロシアニン(F-CuPc)を試料に、生成するナノ粒子のサイズ・形状と作製時のレーザー光強度、温度との関係について調べた。

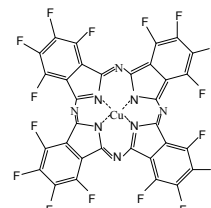


図1. F-CuPc

[実験]市販の F-CuPc 粉末のエタノール懸濁液を濃度 6.3×10^{-3} wt% に調製し、超音波処理を 20 分間行ったものを試料とした。試料懸濁液 2 mL をセルに入れ、攪拌しながら Nd³⁺:YAG レーザーの第二高調波(波長 532 nm, パルス幅 8 ns, 繰り返し 10 Hz, レーザー光強度 35-140 mJ/cm²)を照射し、吸収スペクトルの変化を測定した。また、レーザー照射後のコロイドを室温または 60°C で静置して吸収スペクトルの時間変化を測定した。そして、生成したナノ粒子を FE-SEM, TEM 像で観察した。

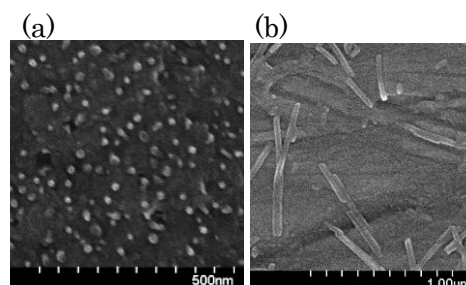


図2. 強度 140 mJ/cm² で(a)照射した直後と (b)2 週間静置した F-CuPc ナノ粒子の SEM 像

[結果と考察]図2に強度 140 mJ/cm² で作製したナノ粒子の SEM 像を示す。照射直後のナノ粒子は平均粒径 24 nm の球状であった。一方、コロイドを室温で静置すると幅の平均値 43 nm, 長さの平均値 353 nm のロッド状に成長した。図3に照射直後と2週間静置後のコロイドの吸収スペクトルを示す。時間とともに波長 780 nm のピークが相対的に増大した。このスペクトル形状の変化はナノ粒子が結晶相転移したためであると考えた。TEM 観察より、2週間静置後のナノロッドは、分子が一次元にスタックした構造であることがわかった。その一次元スタックの格子間隔はβ型 CuPc 結晶の格子間隔(0.98 nm)^[2]

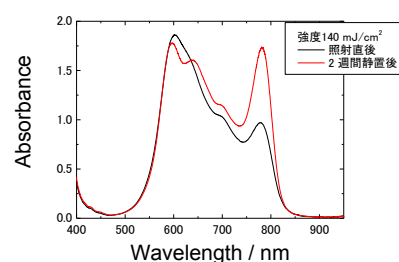


図3. 強度 140 mJ/cm² で作製した直後と2週間静置後のコロイドの吸収スペクトル

表 1. 液中レーザーアブレーション法で作製した F-CuPc ナノ粒子の平均サイズ

レーザー強度 (mJ/cm ²)	保持温度 (°C)	保持時間	幅 (nm)	長さ (nm)	アスペクト比
140	22	6 時間後	23	82	3.8
		2 週間後	43	353	8.6
	60	6 時間後	31	408	13.8
35	22	2 週間後	72	216	3.8

に一致した。これらの結果から、アブレーションによって生成した球状のナノ粒子が会合して、 β 型結晶相のロッドに成長すると考えられる。

レーザー強度及びコロイドの保持温度を変えたときのナノ粒子のサイズを表 1 にまとめる。生成したナノロッドの大きさが作製条件により変化した。強度 140mJ/cm² で作製したコロイドの場合、室温で 6 時間静置後のナノロッドは幅 23 nm, 長さ 82 nm(アスペクト比: 3.8)であった。一方、60°Cで 6 時間静置後のナノロッドは幅 31 nm,長さ 408 nm(アスペクト比: 13.8)であった。また、強度 35 mJ/cm² で作製した場合、室温で 2 週間静置後のナノロッドは幅 72 nm, 長さ 216 nm(アスペクト比: 3.8)であった。よって、高強度で照射し、高温で静置するとアスペクト比の大きなナノロッドが生成することがわかった。

図 4 にそれぞれの条件で作製したコロイドの吸収スペクトルを示す。コロイドの吸収スペクトルは、作製条件に関わらずスペクトル形状が類似していることがわかった。よって、ナノロッドはどの条件で作製しても β 型の結晶相であることが考えられる。

以上の結果より、液中レーザーアブレーション法によって β 型 F-CuPc ナノロッドを作製することができた。また、レーザー強度、保持時間、保持温度によって生成するナノロッドのサイズ・アスペクト比が変化することがわかった。

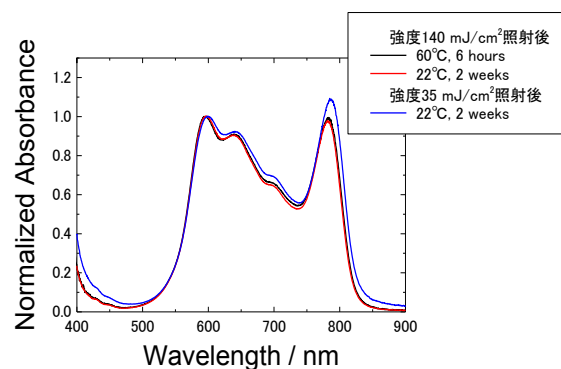


図 4. 強度 35, 140 mJ/cm² で作製し、室温で 2 週間及び 60°Cで 6 時間静置した後のコロイドの規格化した吸収スペクトル

【1】 T. Asahi, T.Sugiyama, H.Masuhara; Acc.Chem.Res., 41(2008),1790-1798

【2】 Santanu Karan, Biswanath Mallik. J.Phys.chem.C.2007, 111, 7352-7365

3P085

イオン液体中のレーザーアブレーションによる金属ナノ粒子の合成 —ホスホニウムカチオンの側鎖の効果—

(同志社大院理工*, 同志社大理工**)○岡副眞也*, 八坂能郎**, 上野正勝**, 木村佳文***

Preparation of metal nanoparticles in ionic liquids by laser ablation - effect of phosphonium cation's side chains -

(Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Doshisha Univ.*, Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science and Engineering, Doshisha Univ.**)

○Shinya Okazoe*, Yoshiro Yasaka**, Masakatsu Ueno**, Yoshifumi Kimura***

1. 緒言

金属ナノ粒子は様々な分野で利用されており、活用が期待される。特に直径が 5 nm 以下の金属ナノ粒子は不活性な金属といわれている金でさえ高い反応活性をもつ。しかしナノ粒子は小さくなればなるほど不安定になり凝集してしまうため、高分子保護剤等で保護する必要がある。イオン液体中に存在するナノ粒子は保護剤なしで安定に存在することができ、新たな反応場として注目されてきた。

これまでにイミダゾリウム系のイオン液体中で、様々な方法で金属ナノ粒子が合成され、保護能が調べられているだけでなく触媒反応の系の探索も行われてきた。その一方で、ホスホニウム系イオン液体中でのナノ粒子の安定性はあまり調べられて来なかった。そこで本実験ではホスホニウム系のイオン液体中で触媒系を構築することを目指し、レーザーアブレーション法により金ナノ粒子を合成しさらに、その安定性を評価した。また、合成した金ナノ粒子にレーザーパルスをさらに照射することで微細化を行い、安定性が粒径に依存するかどうか評価した。

2. 実験

Fig.1 に今回用いた TFSI をアニオンとするイオン液体の構造を示す。イオン液体の合成次の手順で行った。トリアルキルホスフィンとブロモアルカンと反応させ、臭化物イオンをアニオンとするイオン液体を合成した。このイオン液体のアニオン交換を行い、 BF_4^- アニオンのイオン液体とした。合成したイオン液体をアルコールで再結晶することで純度を高めたあと、再びアニオン交換することで TFSI 塩とした。

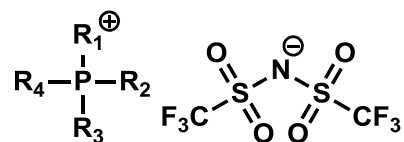


Fig.1 Structure of ionic liquid

次にパルス幅が約 10 ns の Nd:YAG レーザーを用いてイオン液体中でレーザーアブレーション法により室温で金属ナノ粒子を合成した。アブレーション時には攪拌棒に金属板を巻き付け、攪拌しながら合成をおこなった。レーザーパルスの強度は 2 mJ/pulse とし、繰り返し周波数 10 Hz で 10 分間アブレーションを行った。アブレーション後、吸収スペクトルを測定し、金属ナノ粒子の生成を確認した。

続けて金属ナノ粒子の微細化を行った。レーザー照射時間を 50 分間とし、他の条件はアブレーションと同条件で行った。そして微細化終了後に吸収スペクトルを測定した。

3. 結果と考察

Fig. 2 に異なるアルキル鎖長のホスホニウムイオン液体でレーザーアブレーション法により合成した金ナノ粒子の吸収スペクトルを示す。アブレーション直後の吸収スペクトルと 5 日後また 6 日後の吸収スペクトルを比較すると、 $[P_{8888}][TFSI]$ および $[P_{4448}][TFSI]$ 中の金ナノ粒子の吸収スペクトルはそれほど変化していない。しかし、 $[P_{4441}][TFSI]$ 中の金ナノ粒子の吸収スペクトルは明らかに変化している。これは $[P_{4441}][TFSI]$ 中の金ナノ粒子が凝集していることを示している。アブレーションを行ってから 11 日後に測定し金ナノ粒子の透過型電子顕微鏡写真を Fig.3 に示す。Fig.3 の $[P_{8888}][TFSI]$ 中の金ナノ粒子の大きさと比較すると $[P_{4441}][TFSI]$ 中の金ナノ粒子は凝集し大きくなっていることが確認できる。

次に微細化した時の $[P_{8888}][TFSI]$ 中での金ナノ粒子の吸収スペクトルを示す。アブレーション直後の吸収ピークと微細化直後の吸収ピークを比較すると、微細化後の吸収ピークは短波長側にシフトしており、金ナノ粒子が小さくなっていることが確認できる。6 日後には吸収ピークが長波長側にシフトしていることから、わずかに凝集が進行したと考えられる。微細化を行ってから 11 日後に透過型電子顕微鏡で観察し金ナノ粒子の平均粒径を求めると、3.3 nm であり微細化前と比較すると粒径分布がかなり狭くなっていた。

発表当日には粒子径分布の詳細並びに別の金属（銀と鉄）で実験を行った結果も示す。また、実際に触媒系に応用することを考えメタノール等の有機溶媒を加えた際にナノ粒子の凝集が進行するかどうかを差スペクトルから評価する予定である。

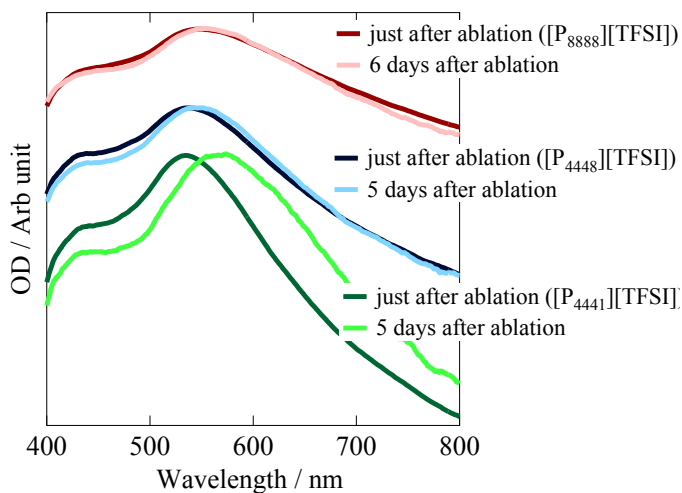


Fig.2 Absorption spectra of gold nanoparticles just after ablation in different ionic liquids

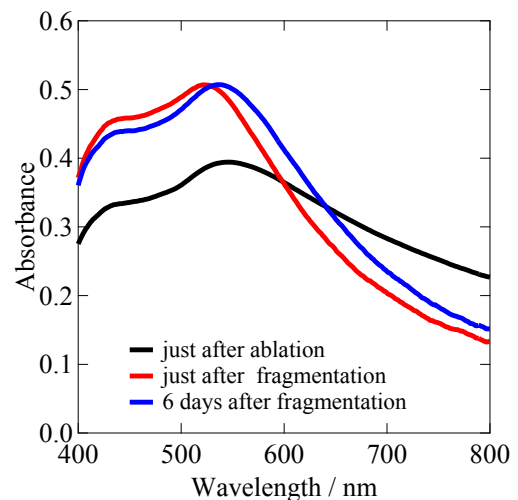


Fig.4 Absorption spectra of gold nanoparticles in $[P_{8888}][TFSI]$

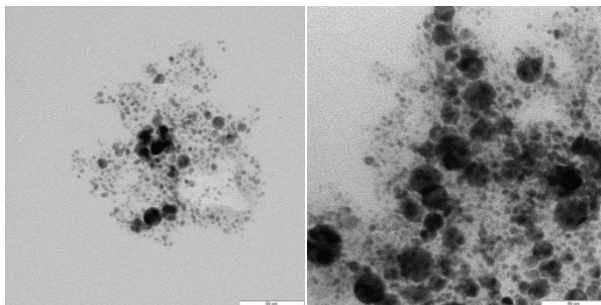


Fig.3 TEM images of gold nanoparticles 11 days after ablation in $[P_{8888}][TFSI]$ (left) and $[P_{4441}][TFSI]$ (right)

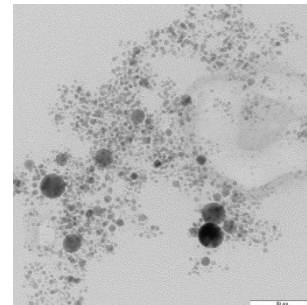


Fig.5 TEM images of gold nanoparticles 11 days after fragmentation in $[P_{8888}][TFSI]$

3P086

フェムト秒強レーザー場によるアモルファスカーボン微粒子の生成： レーザー場強度依存性

(名大院・理¹, 名大・RCMS²) ○林貴大¹, 松田晃孝¹, 菱川明栄^{1,2}

Laser intensity dependence of amorphous carbon particle formation induced by femtosecond intense laser fields

(Dept. Chem., Nagoya Univ.¹, RCMS, Nagoya Univ.²)

○Takahiro Hayashi¹, Akitaka Matsuda¹, Akiyoshi Hishikawa^{1,2}

【序】近年のレーザー技術の発展により、分子内のクーロン電場に匹敵する高強度のレーザー光を発生させることが可能となった。このような強レーザー場に分子をさらすと、ポテンシャル曲面が歪められ、構造変形を起こすことができる。このとき、レーザー場の波形を分子の動きに合わせて適切に変化させることで、反応の制御が可能になると期待されている。こうした研究は、これまで気相単分子解離反応を中心に進められてきた一方で[1]、多体反応についてはまだ始まったばかりである[2,3]。近年我々はフェムト秒強レーザー場における気相エチレンの多体反応に取り組み、強レーザー場において生成された解離フラグメントと親分子の衝突により微粒子が生成されることを見出した(図1)[4]。また、レーザー場強度を変化させることで、微粒子の色が無色から黄色に変化することが確認され、レーザー場強度に依存して構造が大きく変化することが示唆された[5]。本研究では、X線光電子分光(XPS)計測および元素分析を行い、微粒子の構造のレーザー場強度に対する依存性を調べたのでこれを報告する。

【実験】チタンサファイアレーザー再生増幅器(45 fs, 800 nm, 1 kHz, 1.1 mJ/pulse)からの出力を気相エチレン(1 atm)で満たされたガスセル内に集光することで強レーザー場を発生させ、集光に用いるレンズの焦点距離 f を変えることによりレーザー場強度を変化させた。レーザー照射による反応時間を8時間とし、XPS計測に用いる試料はガスセル内にシリコンウエハを挿入することで作成した。また、ガスセル内に残留する生成物を回収し、元素分析を行った。

【結果と考察】XPS計測により得られた微粒子の光電子スペクトルを図1に示す。長焦点レンズ($f=1500$ mm)を用いた場合に生成された微粒子からの光電子スペクトル(図1(a))においては、 sp^3 炭素に由来するピーク(285.4 eV)と、サンプルの空気曝露によって生じたサンプル表面のC-O結合に由来する炭素のピーク(286.2 eV)のみが観測された。一方で、短焦点レンズ($f=750$ mm)を用いた場合に生成された微粒子の光電子スペクトル(図1(b))においては、新たに sp^2 炭素に由来するピークが284.6 eVに観測され、 sp^3 炭素からのピークの相対強度は著しく小さくなった。これらのことから、低いレーザー場強度においては微粒子中の炭素間結合は sp^3 結合が支配的であるのに対し、レーザー場強度の増加に伴い、微粒子中の sp^2 結合比率が増加したことが示された。また、元素分析において、低強度および高強度のレーザー場において生成された微粒子の水素分率はそれぞれ約56 at%、約52 at%であることが見出され、レーザー場強度の増加に伴い、生成される微粒子の水素分率が減少することが示唆された。以上の結果から、低いレーザー場強度におい

では、解離フラグメントと親分子の衝突により sp^3 結合が支配的な無色の微粒子が生成される一方で、高いレーザー場強度においては、C-H 結合の切断などの解離反応が促進されることで、解離フラグメント同士の衝突が進行し、 sp^2 結合が支配的な黄色の微粒子が生成されることが示唆された。

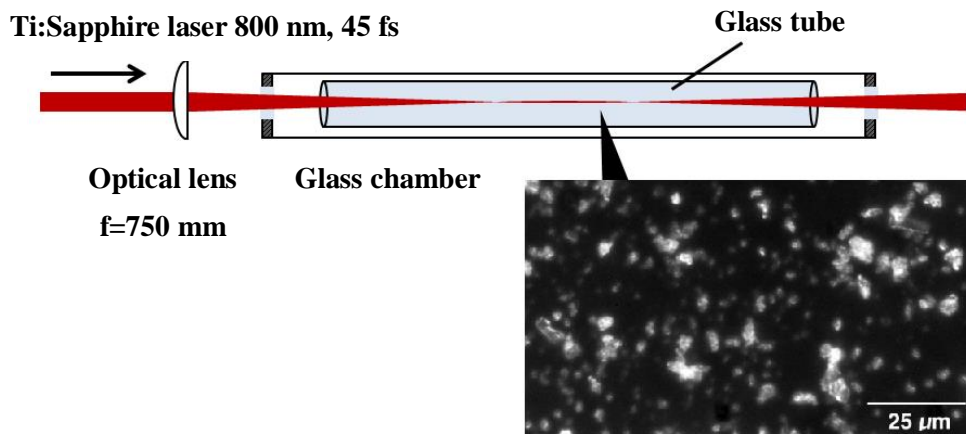


図 1 フェムト秒強レーザー場による気相エチレンからの微粒子の生成

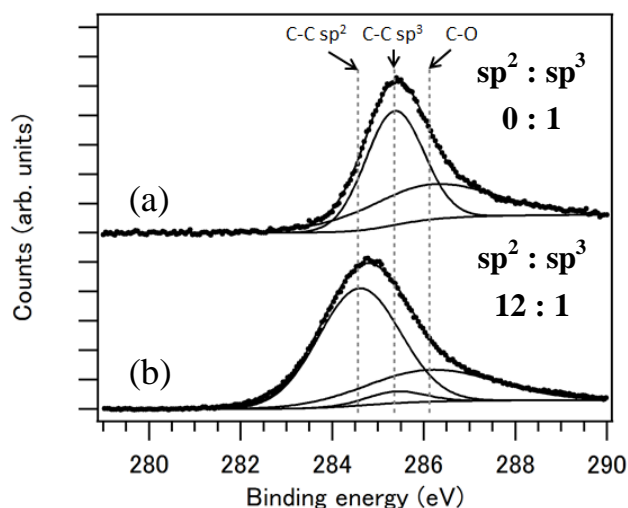


図 2 生成されたアモルファスカーボン微粒子からの光電子スペクトル
(a) 低いレーザー場強度, (b) 高いレーザー場強度

【参考文献】

- [1] R. J. Levis et al., Science 292 (2001) 792.
- [2] A. du Plessis et al., J. Chem. Phys. 135 (2011) 204303.
- [3] S. L. Shumlas et al., Mater. Chem. Phys. 156 (2012) 47.
- [4] 松田ら, 4P018, 第 8 回分子科学討論会.
- [5] 松田ら, 1B07, 第 9 回分子科学討論会.

ジアセチレンナノ結晶固相光重合初期過程の サブピコ秒過渡吸収分光

(広島大院・理¹, 東北大・多元研², 東北大院・理³)

○仮屋 寛悟¹, 梅本 嵩之¹, 小野寺 恒信², 及川 英俊², 五月女 光³,
梶本 真司³, 福村 裕史³, 上田 潔², 和田 真一¹, 平谷 篤也¹

Solid-phase photopolymerization of diacetylene nanocrystals by sub-ps transient absorption spectroscopy

(¹Graduate School of Science, Hiroshima Univ.,

²IMRAM Tohoku Univ., ³Graduate School of Science, Tohoku Univ.)

○K. Kariyazono¹, T. Umemoto¹, T. Onodera², H. Oikawa²,

H. Sotome³, S. Kajimoto³, H. Fukumura³, K. Ueda², S. Wada¹, A. Hiraya¹

【序論】 ジアセチレン(DA)誘導体の有機ナノ結晶は、UV を照射することによって図1のような固相光重合を起こし、ポリジアセチレン(PDA)に変化する。この PDA は π 共役高分子であり、ナノ結晶は3次非線形光学材料としての応用が期待される物質として注目を集めている。一般に固相重合を起こす結晶は、その過程によって分子の並びが大きく変化して結晶が砕けてしまうが、DA の側鎖がメチル基を一つ介したカルバゾール基である 1,6-di(N-carbazolyl)-2-4-hexadiyne (DCHD) 結晶は、UV 照射により結晶の形状を維持したまま重合体 PDCHD 結晶に変化する大変興味深い物質である。図2に DCHD の構造式と、DCHD および PDCHD ナノ結晶の吸収スペクトルをそれぞれ示す。DCHD ナノ結晶は可視光領域に吸収ピークをもたない無色透明な物質だが、重合すると660nmと600nmに励起子吸収とフォノンサイドバンドのピークをもつ紫色の PDCHD ナノ結晶に変化する。この固相重合反応において、UV 照射後どのようにして化学結合の生成や組み換えが起こり、結晶の形状を維持したまま重合が進行するのか、特にその初期過程の知見を得ることは、反応メカニズムを理解する上で非常に重要である。本研究ではサブピコ秒過渡吸収分光法を用いることにより、DCHD ナノ結晶の固相重合初期過程の解明を試みた。

【実験】 DCHD ナノ結晶は、再沈法により分散水として得た。得られた試料は走査型電子顕微鏡(SEM)および、動的光散

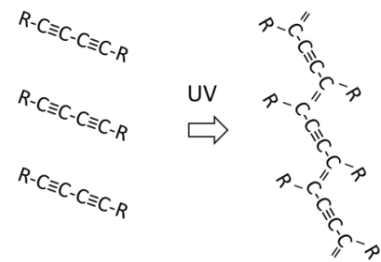


図1. DA の固相光重合反応。

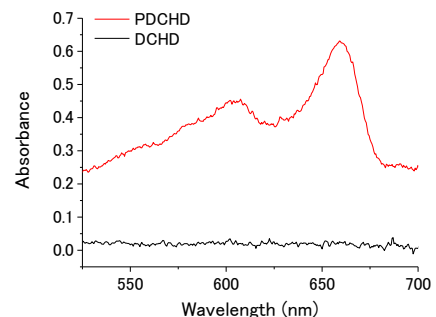
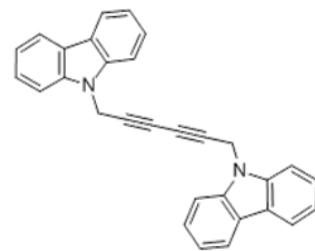


図2. DCHD の構造式と、DCHD と PDCHD ナノ結晶の分散水での吸収スペクトル。

乱法 (DLS) で評価した。使用した平均結晶サイズは約 50nm である。

過渡吸収分光測定には Ti:sapphire フェムト秒レーザー (800nm、110fs、1kHz、1mJ/pulse) を光源として用いた。高調波発生器を用いて生成した波長 266nm のレーザー光をポンプ光として、純水による自己位相変調によって生成した白色光をプローブ光として、それぞれ用いた。試料である分散水を 1mm セル中でフローさせ、ポンプ光を 30 μ J/pulse の強度で白色光とともに集光し、その時間遅延を変えることで過渡吸収スペクトルを得た。

【結果と考察】 図 3 に代表的な遅延時間での過渡吸収スペクトルを示す。UV 照射後、広い波長域にわたるブロードな吸収が観測された。これは、DCHD モノマーの $S_n \leftarrow S_1$ 吸収や $T_n \leftarrow T_1$ 吸収だけでは説明できない。これらの過渡吸収スペクトルから得られる、各波長における吸収強度の時間変化を図 4 に示す。

UV 照射から 13ps 時点で観測されたブロードな吸収は 120ps までほとんど変化しなかった。また、PDCHD 由来の吸収ピーク (660nm と 600nm) が観測されなかったため、これらの遅延時間においてポリマーは形成されていないと考えられる。

図 5 に推察される DCHD 結晶における固相光重合反応の進行モデルを示す。UV 照射後、一重項励起状態を経由してジラジカルである三重項励起状態になったモノマー分子は、付随する分子振動によって隣接する分子と反応し、素早くダイマーを形成すると考えられる。その後、更に隣接する分子が熱振動によって重合に適した位置に回転したとき、トライマーが形成される。その後も同じ様にテトラマー、ペンタマー…と形成されていくが、トライマー以降の形成では隣接するモノマー分子が重合しやすい配向になることが律速となるため、ダイマー形成よりも時間を要すると考えられる。一方、ブロードな吸収が波長依存なく同時に発生していることから、生成したダイマーには様々な過渡種、ジラジカルその他にジカルベンやその複合体が形成されていることも示唆される。

以上の考察によって、DCHD ダイマーは UV 照射から 10ps 以内で素早く形成され、その後 120ps を経てもトライマー以降のオリゴマーの形成はなされていないという光重合過程が考えられる。

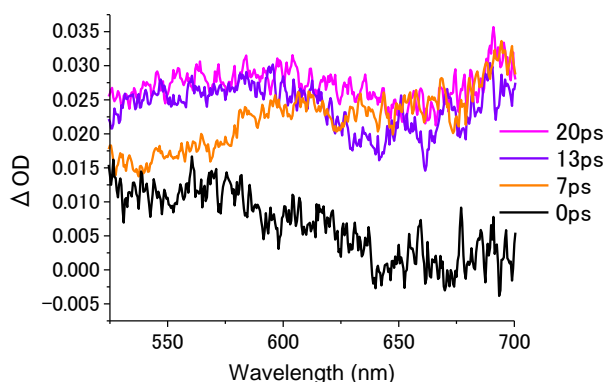


図 3. DCHD の過渡吸収スペクトル。

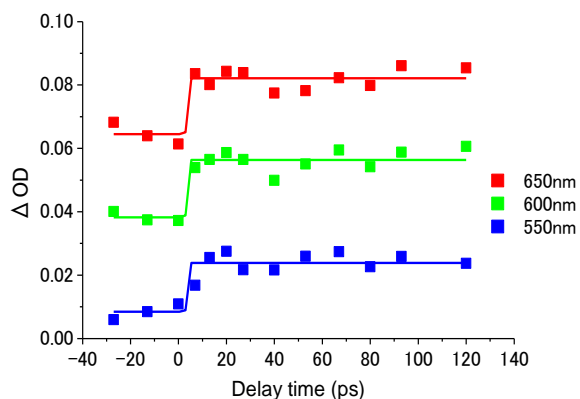


図 4. 各波長における吸収強度の時間変化。

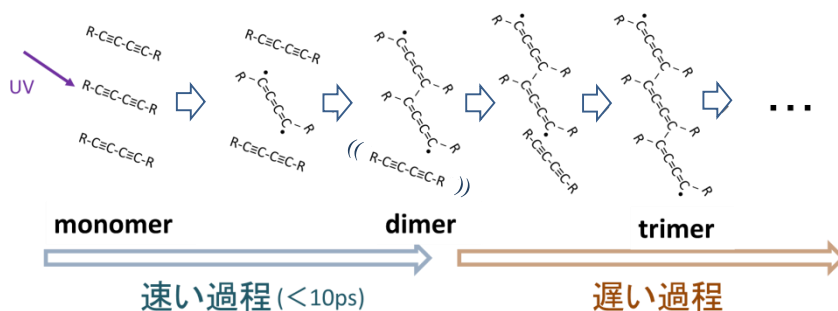


図 5. DCHD の固相重合反応の進行モデル。

3P088

電子線照射ポリスチレン自己集合体の二光子励起特性の究明 (早大院先進理工) ○香村惟夫, 井村考平

Optical properties of electron beam irradiated polystyrene nanosphere assembly studied by linear and nonlinear optical microscopy (Waseda University) ○Yoshio Kamura, Kohei Imura

【序】ポリスチレン球は、自己組織化により容易に集合体を形成する。ポリスチレン自己集合体は光と強く相互作用するため、線形光学や非線形光学の分野で応用が期待される。また、ポリスチレン粒子のサイズや色素ドーブにより自己集合体の光学特性の制御が可能である。さらに、ポリスチレン分子に光化学反応を誘起し、光学特性の制御も可能である。本研究では、電子線照射したポリスチレン自己集合体の光学特性や反応生成物を究明することを目的とした。

【実験】ポリスチレン自己集合体は、ガラス基板上にポリスチレン球(直径：500 nm)を展開し自己組織化により作製した。試料の光学特性は、カソードルミネッセンス (CL) 測定および一光子・二光子発光測定により評価した。一光子発光測定では、紫外光を光源として用いた。一方、二光子発光測定では、モードロックチタンサファイアレーザー (中心波長：800~820 nm, パルス幅：<60 fs) を光源として用いた。さらに、化学反応生成物の同定には、電子吸収分光法, 全反射赤外吸収分光法, マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 質量分析法を用いた。

【結果と考察】図1に電子線照射時間を変化させて測定したポリスチレン自己集合体の CL スペクトルを示す。スペクトルには、330 nm および 500 nm 近傍にピークが観測された。短波長のピークは、ポリスチレンのエキシマー発光に帰属される [1]。この発光ピークは、電子線照射の時間とともに減少する一方、500 nm 近傍の発光ピークが相対的に増加することが観測された。可視域に生じる発光は、通常ポリスチレンからは観測されない発光である。したがって、可視域の発光は電子線により誘起された反応生成物由来であることを示唆している。電子線照射前後の試料の一光子励起発光スペクトルでは、330 nm 近傍にエキシマー発光のピークが観測された。この発光ピーク強度は、CL スペクトルと同様に電子線の照射時間とともに減少することが分かった。しかし、CL スペクトルで観測された可視領域における発光ピークは観測されなかった。図2に、電子線照射前後のポリスチレンの二光子励起発光スペクトルを示す。電子線照射後の試料において、500 nm 近傍に CL スペクトルと類似した二光子励起由来の発光ピークが観測された。一方、電子線照射前の試料には二光子励起由来の発光ピークは観測されなかった。以上の結果より、電子線照射した試料の可視域の発光は一光子禁

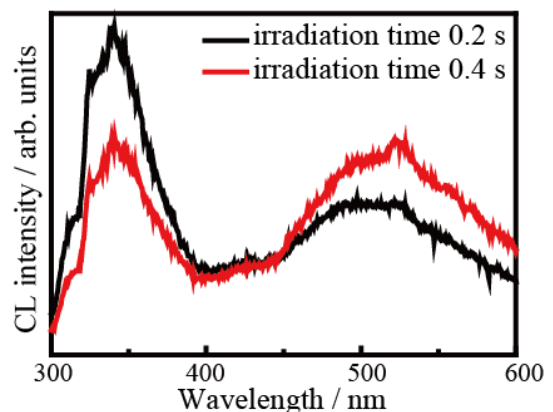


図1. ポリスチレン自己集合体の CL スペクトル。電子線照射時間 (黒線：0.2 秒間, 赤線：0.4 秒間)。

制，二光子許容の励起状態が発光過程に関与することが分かった。

次に，電子線照射したポリスチレン自己集合体の反応生成物の同定について述べる。図3に電子線照射前後の規格化赤外吸収スペクトルを示す。規格化には，電子線照射前後で吸収強度が等しい 1452 cm^{-1} のバンドを用いた。図3のスペクトルから，電子線照射後に新たな振動バンドが観測されない一方で，幾つかのバンドにおいて強度変化が観測された。図3のインセットに電子線照射前後の差スペクトルを示す。差スペクトルでは， 700 cm^{-1} 近傍において顕著な変化が観測される。このバンドはフェニル基のC-H面外変角振動に帰属される[2]。図4に電子線照射前後の試料のMALDI質量スペクトルを示す。電子線照射前では低質量側であった質量分布が，電子線照射後では高質量側に分布がシフトすることがわかる。スペクトル中に観察される周期的なピークの隣接ピークとの質量差は，104でありモノマーの質量と一致する。電子線照射前後のスペクトルは，ともにこの周期性が保たれている。このことは，電子線照射後の試料においてポリスチレン骨格が保持されていることを示す。また，電子線照射前の試料の重合度は約10であり，電子線照射後の試料は重合度が約20である。以上の結果は，電子線照射により概ね2本のポリスチレンが架橋していることを示唆する。電子線照射前後の電子吸収スペクトルは，照射前の試料では 260 nm 近傍に，照射後の試料では 280 nm 近傍に吸収ピークを示す。吸収ピークの長波長シフトは，共役系の生成を示唆する。以上の結果から，電子線照射によりポリスチレンにおいて架橋反応が進行するとともに共役系部位が生成し，これが一光子禁制・二光子許容の励起特性を示すことが明らかとなった。

【参考文献】

- [1] M.T. Vala Jr., J. Haebig, and S. A. Rice, *J. Chem. Phys.*, **43**, 886 (1965).
- [2] C.Y. Liang, and S. Krimm, *J. Polymer Sci.*, **27**, 241 (1958).

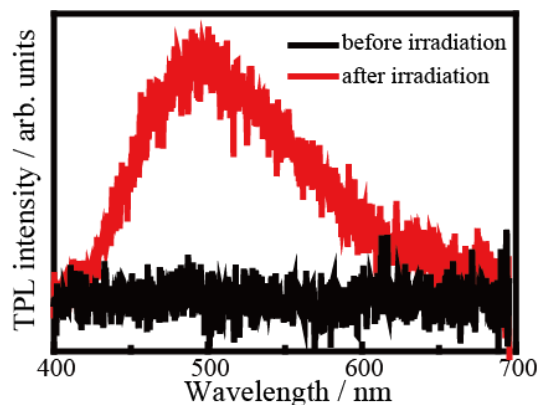


図2. 電子線照射前後のポリスチレン自己集合体の二光子励起発光スペクトル (黒線：電子線照射前，赤線：電子線照射後)。

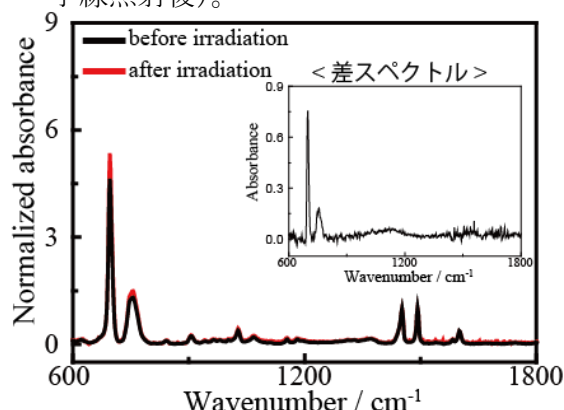


図3. 電子線照射前後のポリスチレン自己集合体の赤外吸収スペクトル (黒線：電子線照射前，赤線：電子線照射後)。インセット：差スペクトル (電子線照射後－電子線照射前)。

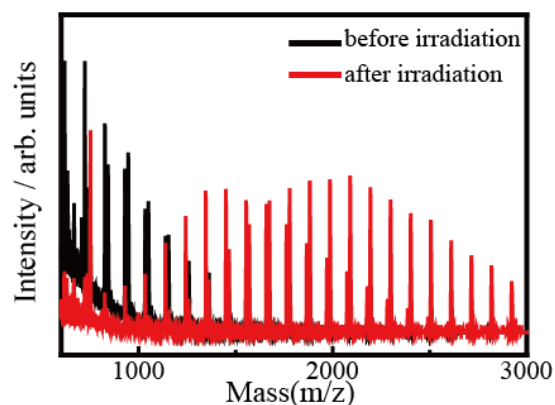


図4. 電子線照射前後のポリスチレン自己集合体の質量スペクトル (黒線：電子線照射前，赤線：電子線照射後)。

3P089

Covalent Organic Frameworks as Sulfur Hosts for Lithium–Sulfur Batteries

(名古屋大学物質科学国際研究センター)

○吴洋, 張中岳, 阿波賀邦夫

(RCMS Nagoya Univ.)

○Yang WU, Zhongyue ZHANG, Kunio AWAGA

[Introduction]

Electrical energy storage is one of the most critical needs of 21st century society. Lithium-sulfur batteries (LSBs) have attracted considerable attention from both the academic and industrial communities for their potential capability of meeting practical applications in new electrical energy storage. LSBs have many conspicuous advantages, such as a high theoretical capacity of 1675 mAh/g, low cost, natural abundance and environmental friendliness, which making LSBs become one of the most promising next-generation batteries. The shuttling process involving lithium polysulfides is one of the major factors responsible for the degradation in capacity of LSBs. Two approaches have been employed to overcome this defect: one is to load sulfur into high porous materials, and another is to combine sulfur and to form a cross-linked polymer. We supposed that a combination of the two approaches using covalent organic framework-graft-polysulfide (COF-graft-PS) would be an efficient methodology. A COF-graft-PS was synthesized by graft co-polymerization of elemental sulfur onto the skeleton of a functionalized COF. The polysulfide can be robustly impregnated into the pores through the strong covalent bonds between COF and sulfur. The COF serves as the host as well as the cross-links of polysulfides.

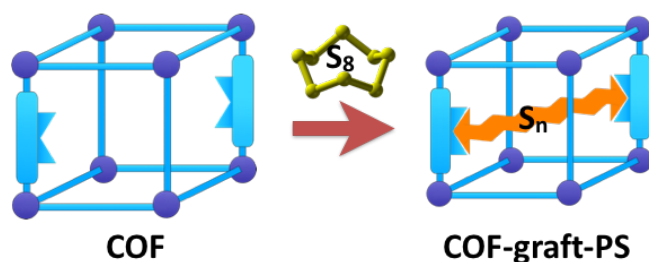


Figure 1. Synthetic strategy of COF-graft-PS in this research.

[Experimental]

Firstly, an alkynyl group functionalized COF was synthesized by a typical solvothermal method. Then, the COF and sulfur were mixed and heated. By copolymerization of sulfur and functional groups on the surface of the COF pores, the sulfur can be robustly impregnated into the pores through the strong covalent bonds between host and sulfur and the COF-graft-PS will be generated. The COF-graft-PS was utilized as the cathode for LSBs and the electrochemical properties were tested.

[Results and Discussion]

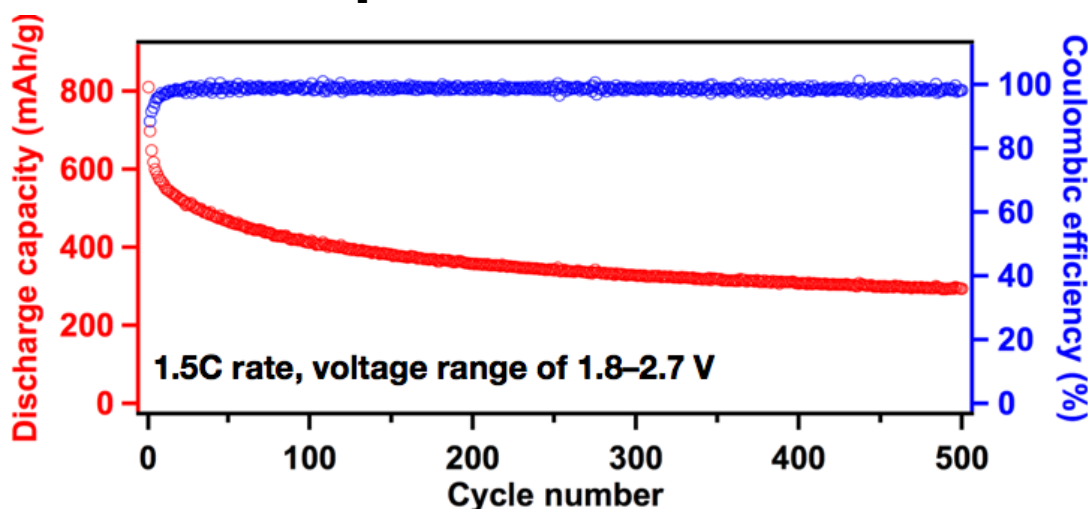


Figure 2. Cycling performance of COF-graft-PS over 500 cycles at a charge/discharge rate of 1.5 C rate.

The COF-graft-PS based LSBs show high capacity and great cycling performance. The stable cycling performance is due to the robust sulfur cathode structure in which sulfur is homogeneously distributed throughout the regular pores within the framework together with the C-S covalent links. The chemical sulfur impregnation within the pores of COF effectively suppresses the dissolution of polysulfides into the electrolyte.

3P090

緑色蛍光タンパク質 GFP 発色団の励起状態失活過程におけるタンパク質・溶媒環境の役割 (¹理研・田原分子分光、²理研・光量子工学領域、³東邦大・理)

○倉持光^{1,2}、細井晴子³、藤澤知績¹、竹内佐年^{1,2}、田原太平^{1,2}

Role of protein/solvent environment on the deactivation process of green fluorescent protein chromophore in the excited state

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN¹, Ultrafast Spectroscopy Research Team, RIKEN Center for Advanced Photonics (RAP)², Department of Biomolecular Science, Faculty of Sciences, Toho University³)

Hikaru Kuramochi^{1,2}, Haruko Hosoi³, Tomotsumi Fujisawa¹, Satoshi Takeuchi^{1,2}, and Tahei Tahara^{1,2}

Green Fluorescent Protein (GFP)は生体イメージングにおいて欠かすことのできない蛍光タンパク質である。近紫外光吸収に伴い GFP の発色団は~10 ps の時定数をもって励起状態プロトン移動 (Excited-State Proton Transfer, ESPT)を起こし、フェノール部位のプロトンがタンパク質中にて形成される水素結合ネットワークを通じてグルタミン酸 (E222) へと渡される。結果として生成する脱プロトン化したアニオン型の発色団から緑色(~510 nm)の蛍光が生じる。一方で溶液中における GFP 発色団モデル化合物 HBDI

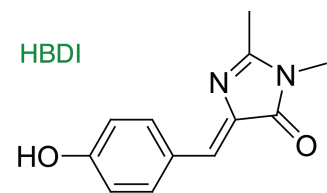


図 1. GFP 発色団モデル化合物、(cis-)HBDI の構造。

(4'-hydroxybenzylidene-2,3-dimethyl-imidazolinone, 図 1) の励起状態失活過程はタンパク質中のそれとは大きく異なり、光励起後わずか 1 ps 以内に内部転換過程を通じ電子基底状態に緩和する[1,2]。励起状態において進行する cis-trans 異性化がこの超高速失活過程の要因であることが理論的研究などから示唆されている。またタンパク質・溶媒環境がこの失活過程に大きな影響を与えると考えられているが、その実験的な検証、特に構造学的知見は乏しい。そこで我々はフェムト秒時間分解インパルスラマン分光法 (Time-Resolved Impulsive Stimulated Raman Scattering, TR-ISRS [3])を用い溶液中における HBDI のフェムト秒構造ダイナミクスの観測を行った。また以前我々が報告した野生型 GFP の励起状態ラマンスペクトル [4]との比較を行い、タンパク質環境が励起状態ダイナミクスに及ぼす役割について検討した。

TR-ISRS ではまず光反応を開始させるための励起光 (390 nm, 90 fs) により電子励起状態を生成させる。任意の遅延時間 ΔT の後、HBDI の誘導放出遷移 ($S_1 \rightarrow S_0$) に共鳴する可視極短パルス (520-700 nm, 7 fs) を照射し、インパルス誘導ラマン散乱過程を利用し電子励起状態に核波束運動を誘起した。この核波束運動を時間分解吸収信号のビート成分の形でプローブ光 (520-700 nm, 7 fs) を用いて検出し、励起状態の分子振動を時間領域で観測した。

まず図 2 に野生型 GFP と溶液 (メタノール) 中における HBDI の基底状態の誘導ラマンスペクトルを示す。多くのバンドが広い周波数領域に渡って両者に共通して観測されているが、 $>1500 \text{ cm}^{-1}$ にて観測される C=C, C=N, C=O 伸縮振動といった分子の骨格構造を鋭敏に反映するようなバンドに大きなピーク波数の違いは見られない。この結果はタンパク質・溶液中において発色団の骨格構造は基底状態では大きく異なることを示唆する。

次に TR-ISRS を用いたメタノール中における HBDI の励起状態構造ダイナミクス測定の結果を示す(図 3)。光励起後各遅延時間における励起状態での核波束運動に伴うビート信号(a)を測定し、これら時間領域信号をフーリエ変換することで周波数領域の振動スペクトル(b)を得た。観測された振動バンドは HBDI 励起状態の寿命に対応して ~ 0.4 ps の時定数で減衰するが、この間に大きなスペクトル形状の変化、波数のシフトは観測されない。この結果は観測されたラマンスペクトルは励起状態の準安定構造に由来することを示唆する。図 3c に観測された

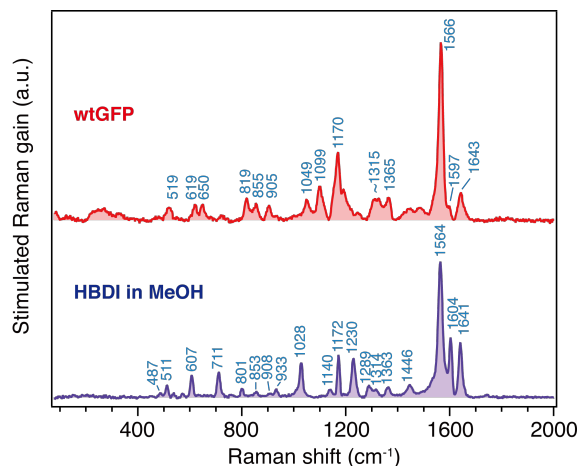


図 2. 野生型 GFP と溶液中における HBDI の基底状態ラマンスペクトル($\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm).

メタノール中における HBDI 励起状態のラマンスペクトルと野生型 GFP の励起状態ラマンスペクトルとの比較を示す。特筆すべきことに両スペクトルは共鳴条件はほぼ同じであるにもかかわらず、強度パターンと波数の両方において互いに大きく異なっている。基底状態ラマンスペクトルの高い類似性を考慮すると、この結果は光励起後、励起状態の準安定状態に至るまでの非常に短い時間スケールで両者の構造の違いが現れることを示唆する。発表ではアニオン型 HBDI の測定結果も含め、野生型 GFP と溶液中における HBDI の励起状態ダイナミクスについて詳細に議論する。

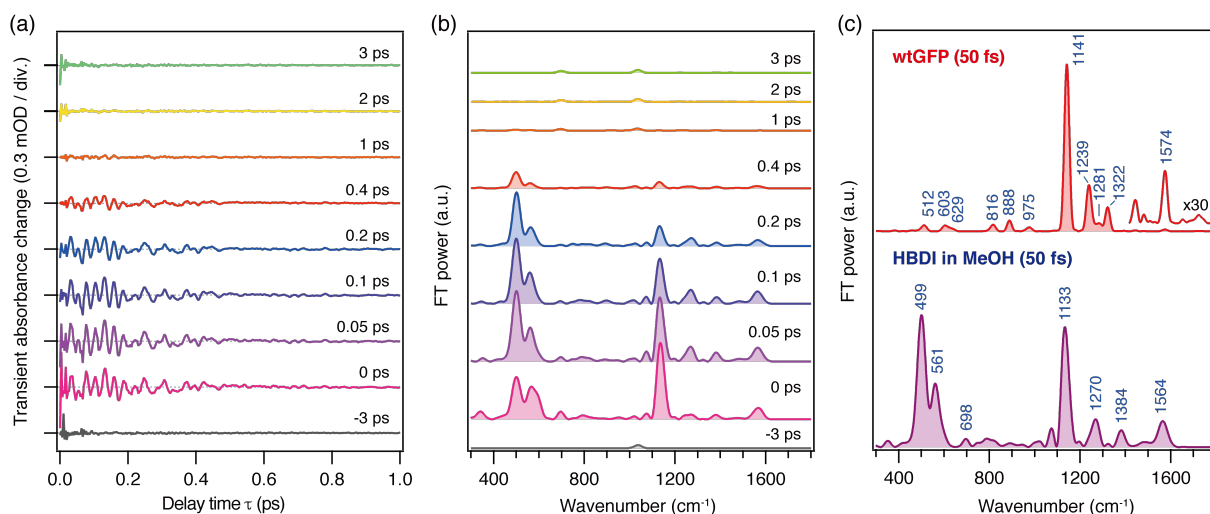


図 3. (a) 光励起後各遅延時刻 ΔT において得られた TR-ISRS 信号のビート成分. (b) TR-ISRS 信号のビート成分のフーリエ変換パワースペクトル. (c) 野生型 GFP と溶液中における HBDI の励起状態ラマンスペクトルの比較.

【参考文献】

- [1] D. Mandal, T. Tahara, S. R. Meech, *J. Phys. Chem. B* **108**, 1102-1108 (2003).
- [2] M. Vengris, I. H. M. van Stokkum, X. He, A. F. Bell, P. J. Tonge, R. van Grondelle, D. S. Larsen, *J. Phys. Chem. A* **108**, 4587-4598 (2004).
- [3] H. Kuramochi, S. Takeuchi, T. Tahara, *Rev. Sci. Instrum.* **87**, 043107 (2016).
- [4] T. Fujisawa, H. Kuramochi, H. Hosoi, S. Takeuchi, T. Tahara, *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3942-3945 (2016).

3P091

異なる CO₂ 濃度下で培養されたシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光合成初期過程の変化

(神戸大院・理¹、神戸大院・工²、神戸大・分子フォト³)

○池田志保¹、藍川晋平²、近藤昭彦²、秋本誠志^{1,3}

Changes in primary processes of photosynthesis in a cyanobacterium cultivated under different CO₂ concentrations.

(Kobe Univ.) ○IKEDA, Shiho¹; AIKAWA, Shimpei²; KONDO, Akihiko²; AKIMOTO, Seiji^{1,3}

【序論】酸素発生型光合成生物であるシアノバクテリアは、チラコイド膜内に光化学系 I (PSI) と光化学系 II (PSII)、チラコイド膜外にアンテナ複合体であるフィコビリソーム (PBS) を持つ。PSI は主に三量体、PSII は二量体として存在することが知られている。これらの複合体の中には光合成色素が含まれており、そこで光捕集と励起エネルギー移動が進行する (図 1)。PBS から PSII への励起エネルギー移動以外にも、PSII から PSI (スピルオーバー) や

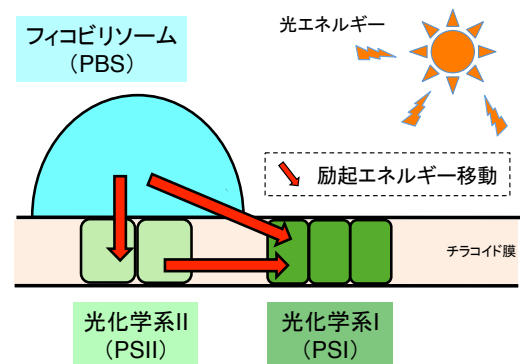


図 1. シアノバクテリアの励起エネルギー移動過程

PBS から PSI への励起エネルギー移動が存在することで、PSII と PSI のバランスが保たれている。

またシアノバクテリアは、約 27 億年前から今日まで環境の変化に順応してきた。その間地球の CO₂ 濃度にも変動があり、現在の CO₂ 濃度 (約 0.04%) はシアノバクテリアが誕生したときの 100 分の 1 以下に減少したと考えられている [1]。CO₂ 濃度の変化は、シアノバクテリアの色素組成や PSI と PSII の蛍光強度比に変化を及ぼすと報告されているが [2,3]、励起エネルギー移動過程への影響の詳細は不明である。本研究では分光学的手法を用いて、異なる CO₂ 濃度で培養したシアノバクテリア細胞における励起エネルギー移動過程の違いについて調べ、考察した。

【実験】CO₂ 濃度は 3 種類用意した。まず CO₂ 濃度無調整の大气下で、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の前培養を行った。その後 CO₂ 濃度を調整して 0.4% と 4% でそれぞれ継代培養 (7 日間×2) し、さらに 3 日間培養したものをサンプルとして用いた。加えて、前培養の後も CO₂ 濃度を調整せず 3 日間培養したものをコントロールサンプルとした。定常吸収・定常蛍光発光スペクトル、および、時間分解蛍光スペクトル (TRFS) を測定した。測定はすべて液体窒素温度 (77 K) で行った。TRFS の測定では、全ての色素が励起される 408 nm を励起波長とし、時間相関単一光子計数法を用いた。また、各波長の蛍光減衰曲線について共通の時定数を用いるグローバル解析を行うことで、Fluorescence decay-associated spectra (FDAS) を得た。

【結果と考察】得られた FDAS と各ピークの帰属を図 2 に示す。PSII 領域では、PSII のコアアンテナ複合体 CP43 (685 nm) と CP47 (695 nm) のピークが確認できる。

第 1 成分 (35–50 ps) では、CO₂ 濃度 0.4% のサンプルで、PSI のピークが長波長シフトしていた。これはスピルオーバーが存在しないこと (後述) に起因する。

第 6 成分 (18–23 ns) では、PSII での電荷再結合を反映して、本来 PSII からの遅延蛍光のみ観測されるが、スピルオーバーが存在すれば PSI からの蛍光も観測される。CO₂ 濃度 0.4% のサンプルのみ PSI 蛍光が観測されておらず、スピルオーバーが存在しないということがわかる。PSII ピークに着目すると、コントロールサンプルと CO₂ 濃度 4% のサンプルでは CP43 よりも CP47 の蛍光強度が大きい。

CO₂ 濃度 0.4% のサンプルではピークの分裂が見られず、CP43 と CP47 の蛍光強度はほぼ等しい。このことから、CO₂ 濃度 0.4% のサンプルでは PSII 内における CP43 から CP47 への励起エネルギー移動が抑制されていることがわかる。CP43 から CP47 への励起エネルギー移動は PSII 単量体よりも二量体で促進されると報告されていることから [4]、CO₂ 濃度 0.4% のサンプルでは PSII が単量体としても存在していることが示唆された。

特に CO₂ 濃度 0.4% のサンプルで、光化学系内、光化学系間での励起エネルギー移動が変化していることがわかった。色素組成に関しても CO₂ 濃度 0.4% のサンプルのみ、PBS の相対色素量が増加していた (図 3、630 nm 付近のピーク)。これは、PBS から PSI への直接的な励起エネルギー移動が促進されていることと対応づけられる。

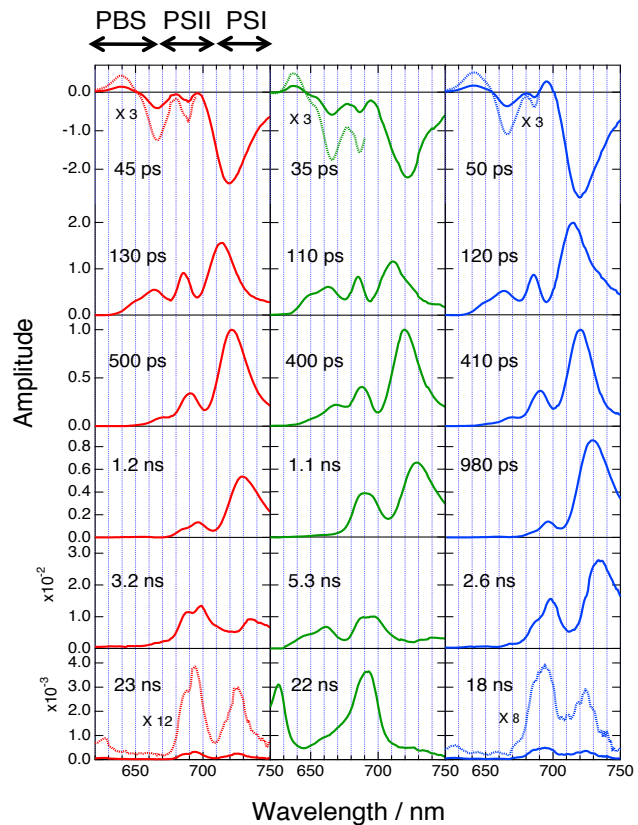


図 2. 3 種類の CO₂ 濃度で培養したシアノバクテリアの FDAS (左) control、(中央) CO₂ 濃度 0.4%、(右) CO₂ 濃度 4%

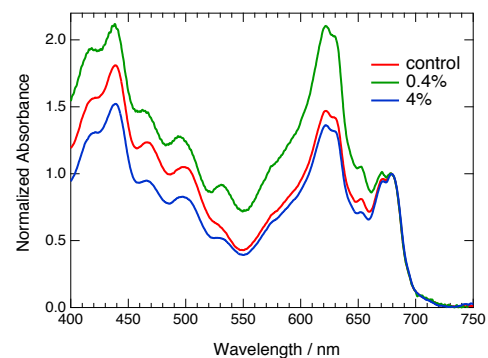


図 3. 定常吸収スペクトル
クロロフィルの吸収ピーク 679 nm で規格化

【文献】

- [1] R. A. Berner, *Nature*. **2003**, 426. ; [2] A. Manodori, A. Melis, *Plant Physiol.* **1984**, 74, 67. ;
- [3] S. Miyachi, I. Iwasaki, Y. Shiraiwa, *Photosynth. Res.* **2003**, 77, 139. ;
- [4] M. Yokono, T. Tomo, R. Nagao, H. Ito, A. Tanaka, S. Akimoto, *Biochim Biophys Acta.* **2012**, 1817, 754.

光駆動型ナトリウムポンプのイオン輸送機構

(名工大・院工¹)○小崎裕子¹, 角田 聡¹, 神取秀樹¹

Ion transport mechanism of NaRs.

(Nagoya.Inst.Tech¹)○Yuko Kozaki¹, Satoshi Tsunoda¹, Hideki Kandori¹

【序】

生体を形作る細胞は周囲の環境からの様々な情報入力により機能を進行させる。例えば神経細胞においては神経伝達物質等の特定の分子の結合という入力シグナルが、細胞膜に存在するナトリウムチャンネルの活性化を引き起こし活動電位の発生(神経発火)という機能を発揮する。近年こういった神経活動を光で制御する手法であるオプトジェネティクス(光遺伝学)が注目されている。チャンネルロドプシンやハロロドプシンのような光感受性イオントランスポータータンパクを細胞に導入することで、細胞膜電位やイオン環境を光操作する試みである。

2013年に海洋性細菌である *Krokinobacter eikastus* からナトリウムイオンをポンプするロドプシンである KR2 が発見され、光駆動型ナトリウムポンプ(NaR)の存在が初めて明らかとなった¹。KR2は520 nmの光を吸収すると、発色団である *all-trans* レチナールが *13-cis* 型へと異性化し Na⁺を輸送するためのタンパク質の構造変化を引き起こす。また、競合的に H⁺輸送も行うハイブリッド型のポンプである²。これらの特性は他の多くの NaR に共通するものである。我々は電気生理学的手法を用いることで NaR の Na⁺及び H⁺輸送メカニズムを明らかにすることを目的に以下の実験を行った。

【実験】

電気生理学的手法として、パッチクランプ法を用いた。Fig. 1に示すように哺乳類細胞にガラス電極を挿入することで、細胞膜に存在するイオントランスポーターの活性を電流値、電位値として直接観察する。パッチクランプ法では数 pA(ピコアンペア)という微小電流を検出することが可能な上、数十マイクロ秒オーダーの比較的高い時間分解能を持つ。また、細胞膜電位や、細胞内側と外側の溶液環境を目的に応じて変化させることが可能な事も大きな利点である。

今回の測定にはラットとマウスのキメラ

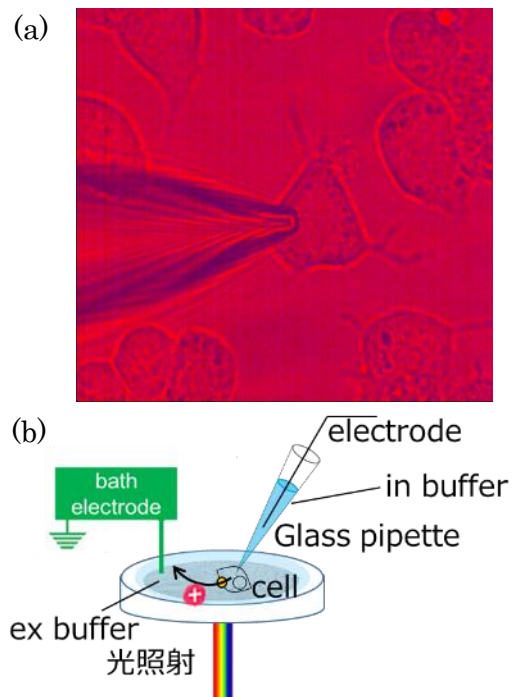


Fig. 1 Patch clamp image of ND7/23 (a) and image of patch clamp method (b).

神経細胞である ND7/23 細胞を用いた。海洋性細菌 *Flagellimonas* sp_DIK 由来の NaR である FdNaR と *Krokinobacter eikastus* 由来の KR2、*Salinarimonas rosea* 由来の SrNaR を ND7/23 細胞に発現させ、イオン輸送活性を測定した。細胞外側と内側を様々なナトリウムイオン環境に変化させ、その際の輸送活性を比較した。

[結果と考察]

KR2 は基底状態において細胞外側の D102 や Y25 周辺にナトリウムイオンを結合している(Fig. 2)³。この外側ナトリウム結合サイトはアミノ酸配列の相同性から FdNaR にも同じく存在すると考えられる。この外側ナトリウム結合サイトへの Na⁺結合・非結合はこれまで Na⁺や

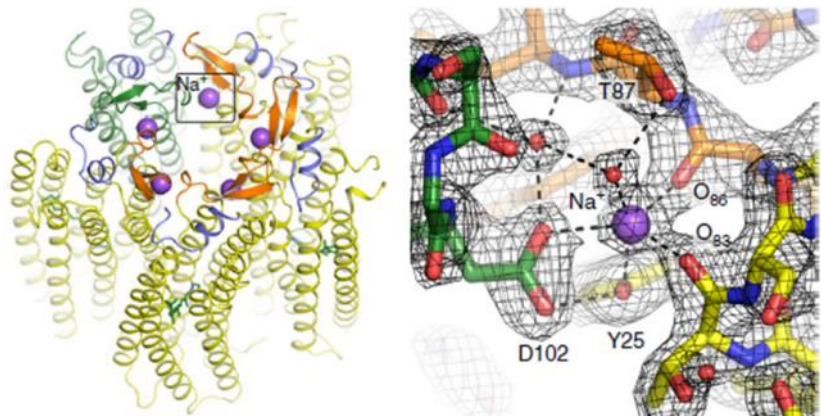


Fig. 2 Position of the sodium ion relative to the pentamerization interface in the KR2 structure.³

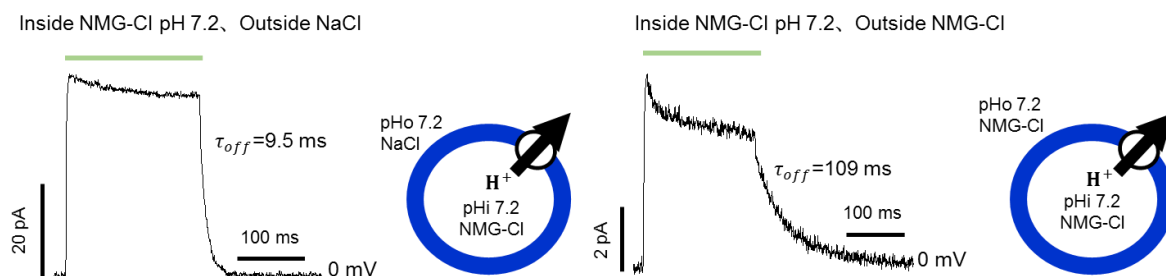


Fig. 3 Representative photocurrent traces of FdNaR recorded in ND7/23 cells. Membrane voltage was clamped 0 mV.

H⁺輸送活性に影響を与えないと報告された。しかし、FdNaR を用いたパッチクランプ測定において、細胞外溶液から Na⁺を除くことで外側ナトリウム結合サイトを Na⁺非結合状態にした場合、H⁺輸送の著しい減少やフォトサイクルの遅延といった興味深い現象が観察された(Fig. 3)。KR2 についても同条件で測定を行ったところ、FdNaR と比べ H⁺輸送の減少は見られなかったものの、フォトサイクルが遅くなっており、輸送活性が減少すると考えられる。これらの結果から、NaR において外側ナトリウム結合サイトは H⁺輸送活性に影響を及ぼしており、Na⁺結合・非結合型で異なったフォトサイクルを有することが予測される。なお、外側ナトリウム結合サイトを持たない SrNaR においては H⁺輸送だけでなく Na⁺輸送の減少も見られたことから、外側ナトリウム結合サイトが Na⁺輸送にも影響を与えていることが示唆された。

(1) Inoue, et al., *Nat Commun.* (2013) **1678**

(2) Y. Kato, et al., *J. Phys. Chem. Lett.*, 2015, *6*(24), pp 5111–5115

(3) Gushchin, et al., *Nat Struct Mol Biol.* 2015 May;22(5):390-5.

3P093

Step-Scan FT-IR を用いた赤外電場吸収測定
システムの開発(東北大薬¹, 東北大院薬²) ○小林 祐輝¹・蓮沼 直樹²・平松 弘嗣^{1,2}・
中林 孝和^{1,2}Construction of an infrared electroabsorption spectrometer using
step-scan FT-IR(Tohoku Univ.) ○Y. Kobayashi・N. Hasunuma・H. Hiramatsu・
T. Nakabayashi

【序】メカノバイオロジーとしてナノ秒パルス高電場を用い、電場印加による細胞および生体分子の応答機構を明らかにすることを目的とする。ナノ秒などの非常に短いパルス高電場を細胞に印加することによって、細胞内イオン濃度の変化やアポトーシスを効果的に誘起できることが報告されており、がん細胞の死滅・疾病の治療などの応用が期待される^{1,2}。しかし、細胞の電場応答機構は不明であり、医療などへの応用のためには電場変化の機構の理解が必須である。ナノ秒パルス電場による細胞変化は、細胞内にある様々なタンパク質や生体分子の電場誘起変化が原因の一つであると考えられる。そのために、生体分子の電場効果を測定することによって、ナノ秒パルス電場効果の機構の知見が得られると考えられる。

そこで本研究では、分子構造を理解する有効な手法の一つである赤外吸収分光法とナノ秒パルス電場を組み合わせた電場変調赤外吸収(IR-EA(electroabsorption))測定システムの開発を行う。IR-EA スペクトルは、外部電場の印加に伴う赤外吸収(IR)スペクトルの変化成分(電場 ON から OFF の差スペクトル)に対応する³⁻⁶。本システムでは、Step-Scan FT-IR とナノ秒パルス電場を用いて、電場印加に伴う IR スペクトルの変化をナノ秒の時間分解測定で得ることを目標とする。

【実験】Step-Scan FT-IR には、真空型の Vertex (Bruker)を用い、試料に電場を導入できるように改良を行っている。窓板にはシリコン板を用い、シリコン部分に電圧を印加した。印加電場は、最大で約 0.45 MV cm⁻¹であった。

【結果】時間分解測定の前段階として、Step-Scan FT-IR を用いた IR-EA スペクトル測定の可能性を検討した。IR-EA の測定において、SNIFTIRS (Subtractively normalized interfacial Fourier transform infrared spectra)を用いた。電場 ON と OFF の繰り返し測定を行い、ON と OFF の測定時間間隔を 50 μs と非常に狭め、差し引くことでバックグラウンドの影響をなくし、微小電場変化の検出を行った。

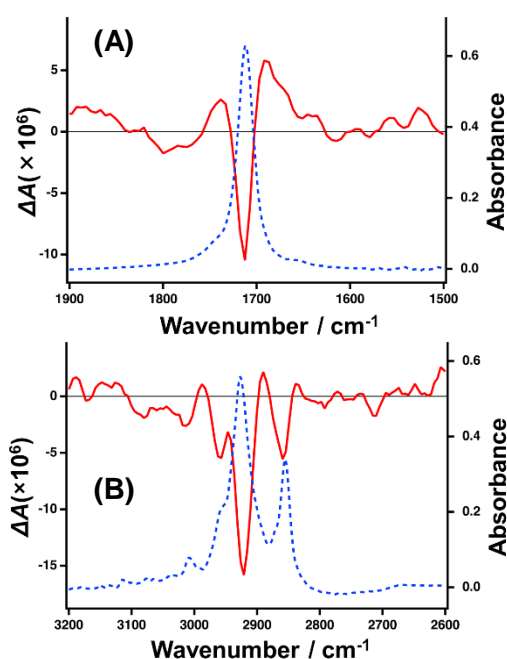


Fig. 1. オレイン酸の(A) C=O 伸縮振動領域と(B) C-H 伸縮振動領域の IR-EA スペクトル (赤実線: IR-EA スペクトル、青点線: IR スペクトル)。

IR-EA スペクトルでは、振動遷移に伴う電気的特性の変化(シュタルク効果)、電場による分子配向の変化などが報告されており³⁻⁶、得られたパラメーターを用いて、生体分子内の官能基周囲の極性環境(局所電場)が定量的に見積もられている⁷。本研究では、基本的な液体分子の IR-EA スペクトルを測定し、シュタルク効果と配向緩和の情報を得ることを行った。ランダム配向における IR-EA スペクトルは、IR スペクトルのゼロ次微分、1次微分、2次微分の線形結合で表すことができる。

$$\Delta A(\nu) = (fF)^2 [A'A(\nu) + B' \nu \{d(A(\nu)/\nu)/d\nu\} + C' \nu \{d^2(A(\nu)/\nu)/d\nu^2\}] \quad (1)$$

F は印加電場、 f は実際に分子が感じる電場の補正項となる。ゼロ次微分の項(A')は振動モードの遷移分極率変化および分子の電場による配向変化を表し、2次微分の項(C')は振動励起に伴う双極子モーメントの変化に対応し、非調和定数などの情報が得られる。1次微分の項(B')は電場による配向変化および振動励起に伴う分子分極率の変化などに依存する。

試料としてオレイン酸を用い、C=O 伸縮振動領域と C-H 伸縮振動領域の IR-EA スペクトルの結果を Fig. 1A と 1B にそれぞれ示す。また、グリセロールの O-H 伸縮振動領域の結果を Fig. 2 に示す。Step-Scan を用いても、 10^{-6} オーダーの微小な電場変化まで観測できることがわかる。C=O 伸縮振動バンドの電場効果の電場強度依存性を Fig. 3 に示す。電場による変化量は、電場の2乗に比例し、式(1)を再現している。

C=O 伸縮振動と O-H 伸縮バンドの IR-EA スペクトルは、2次微分の寄与が支配的であり、振動励起に伴う双極子モーメントの寄与が大きい。式(1)を用いて、オレイン酸の C=O 伸縮振動とグリセロールの O-H 伸縮振動の振動励起に伴う双極子モーメントの変化量は、それぞれ約 $3 \times 10^2 D/f$ 、 $0.3 D/f$ と見積もることができた。これらの振動の非調和性を反映していると考えられる。また、ブロードな O-H バンドが単一のスペクトルで再現することができ、不均一幅内では、IR-EA スペクトルには大きな違いがないことがわかる。一方、C-H 伸縮振動バンドの IR-EA スペクトルは、1次微分と2次微分形の足し合わさった形状となった。

講演では、外部電場と赤外光の電場ベクトルの間の角度依存性の測定を行ない、電場誘起配向変化についても検討した結果も紹介する。

1. K. Zhang, J. Guo, Z. Ge, J. Zhang, *Sci. Rep.* 4 (2014) 5836.
2. R. Nuccitelli, J. C. Berridge, Z. Mallon, M. Kreis, B. Athos, P. Nuccitelli, *PLoS One* 10 (2015) e0134364.
3. S. S. Andrews, S. G. Boxer, *Appl. Spectrosc.* 55 (2001) 1161.
4. H. Hiramatsu, H. Hamaguchi, *Appl. Spectrosc.* 58 (2004) 355.
5. K. Suzuki, K. Takashima, Y. Furukawa, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 7 (2006) 456.
6. T. Nakabayashi, N. Ohta, *Chem. Lett.* 34 (2005) 1194.
7. S. D. Fried, S. Bagchi, S. G. Boxer, *Science* 346 (2014) 1510.

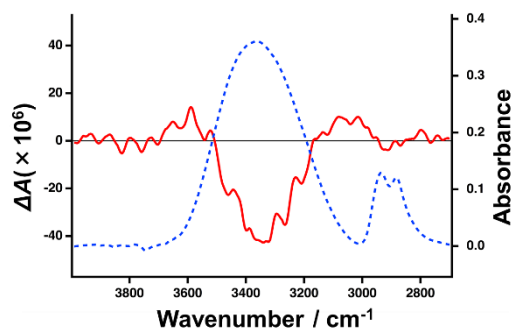


Fig. 2. グリセロールの O-H 伸縮バンドの IR-EA スペクトル (赤実線: IR-EA スペクトル、青点線: IR スペクトル)。

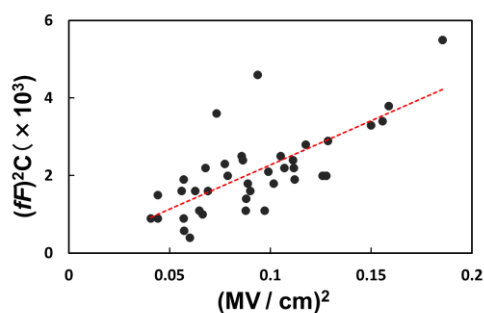


Fig. 3. オレイン酸の C=O 伸縮振動バンドの電場効果の電場強度依存性。

生活環境バイオフィルムの顕微ラマン分光イメージング

(関学大院・理工) ○佐々木舞、重藤真介

Raman Microspectroscopic Imaging of a Life Environment Biofilm
(Graduate School of Science and Technology, Kwansai Gakuin Univ.)

○Mai Sasaki, Shinsuke Shigeto

【序論】私たちの身の回りには、様々な微生物が生息している。その中で、固着性の微生物は、集団で固液あるいは気液界面に構造体を形成する。このような集団微生物の構造体をバイオフィームと呼ぶ。バイオフィーム中の微生物は浮遊状態の微生物とは性質が大きく異なることから、近年注目を集めている。浴室や台所に発生するぬめりは、私たちの生活環境に存在するバイオフィームの一例である。これらのバイオフィームは乾燥や洗浄剤に対する耐性を備えているので、その分子レベルでの解析はバイオフィームの形成を抑制する表面コーティングや効果的にバイオフィームを除去する界面活性剤の開発などの点から重要である。しかし、生活環境バイオフィームの詳細な研究例は少ない。本研究では、顕微ラマン分光法を用いて、浴室の排水溝付近に形成されたバイオフィームの組成を空間分解して調べることを試みた。ラマン分光法は、非破壊・非侵襲かつ染色を必要としない分光手法であるので、バイオフィーム試料をそのままの状態で測定することができる [1,2]。また、ラマン分光法は赤外分光法と比べて水の妨害を受けにくいという利点を有しているため、水回りに形成されるバイオフィーム中の振動スペクトル測定に適している。

【実験】浴室の排水溝付近より採取したバイオフィームをスライドガラス上で薄くのばし、カバーガラスをのせてマニキュアで密閉し、プレパラートを作成した。バイオフィームの空間分解ラマンスペクトルの取得には共焦点顕微ラマン分光装置(inVia, Renishaw 社製)を用いた。励起レーザー波長は 532 nm、試料におけるレーザーパワーは約 3 mW、露光時間は 60 s または 120 s とした。

【結果・考察】バイオフィーム中のいくつかの点で得られた空間分解ラマンスペクトルを図 1、2 に示す。図 1(a)を見ると 1741, 1655, 1438, 1297 cm^{-1} にラマンバンドが観測されていることから試料バイオフィーム中には脂質が含まれていることがわかる。

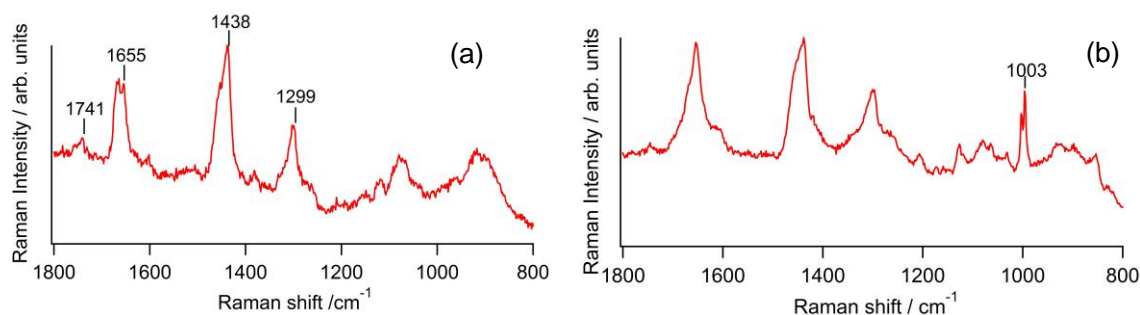


図 1 : 浴室バイオフィーム中で観測された脂質(a)とタンパク質(b)のラマンスペクトル。

また、図 1(b)をみると脂質に特有のバンドに加え、 1003 cm^{-1} に鋭いピークが観測されており、これはタンパク質のフェニルアラニン残基によるものだと考えることができる。これらはバイオフィームを形成する微生物由来もしくは浴室排水に含まれていた有機物由来であると考えられる。

バイオフィーム中に広範囲で観測されたラマンスペクトルを図 2 に示す。図 1 のスペクトルとは全く異なるパターンを示し、 1513 , 1154 , 1007 cm^{-1} に目立った 3 本のラマンバンドが観測された。これらのバンドはカロテノイドに特徴的なバンドであり、それぞれ $\text{C}=\text{C}$ 二重結合伸縮振動、 $\text{C}-\text{C}$ 単結合伸縮振動、 $\text{C}-\text{CH}_3$ 横揺れ振動に帰属される[2]。この結果から、浴室バイオフィームを構成する微生物はカロテノイドを有することが明らかになった。カロテノイドは抗酸化剤として働くことが知られており、バイオフィーム中の微生物のストレス耐性機構と密接に関係していると考えられる。したがってカロテノイドのバイオフィーム内での局在の解明は非常に重要である。バイオフィーム中のカロテノイドに関するより詳細な知見を得るため試料中の異なる点で測定した空間分解ラマンスペクトルを図 3 に示す。いずれのスペクトルにおいても 1513 , 1154 , 1007 cm^{-1} にカロテノイドのラマンバンドが観測された。それら 3 本のバンドに加えて、 1128 cm^{-1} にもはっきりとしたピークが見える。 1128 , 1154 cm^{-1} における隣接した 2 本のバンドは、カロテノイドの共役二重結合鎖におけるシス - トランス異性体を反映しているものと考えられる。図 3 から 1128 , 1154 cm^{-1} のピーク強度比がバイオフィーム内の場所に大きく依存することがわかる。このことは、複数種類のカロテノイドがバイオフィーム中で不均一に分布していることを示しており、非常に興味深い。このような情報は他の分析法では得難いもので、ラマン分光法の環境バイオフィーム分析に対する有用性を示すものである。

[1] H. Ventaka, N. Nomura, S. Shigeto, *J. Raman Spectrosc.* **42**, 1913–1915 (2011)

[2] Y.-T. Zheng, M. Toyofuku, N. Nomura, S. Shigeto, *Anal. Chem.* **85**, 7295 (2013)

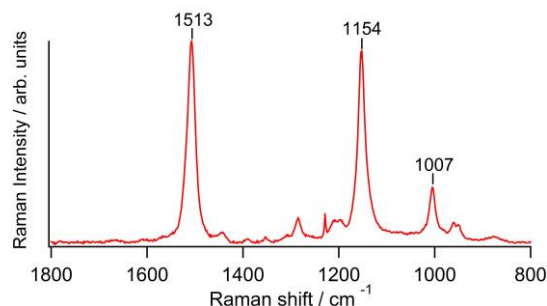


図 2：浴室バイオフィーム中で観測されたカロテノイドのラマンスペクトル。

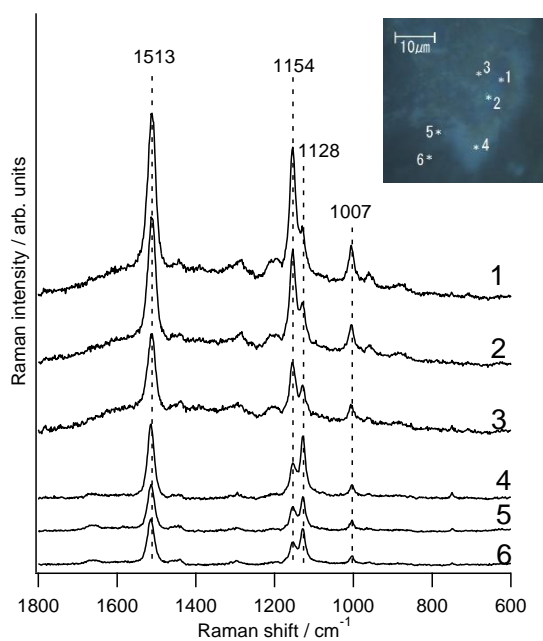


図 3：バイオフィーム試料の空間分解ラマンスペクトル。(測定点 1~6 を挿入図である光学顕微鏡像に示す。)

3P095

精度 1 nm で三次元位置決定ができるクライオ蛍光顕微鏡の光学シミュレーション

(東工大・物理) ○古林 琢、松下 道雄、藤芳 暁

Optical simulation of cryogenic fluorescence microscope

for three-dimensional localization of single dyes with a nanometer precision

(Dept. Physics, Tokyo Tech.) ○Taku Furubayashi, Michio Matsushita, Satoru Fujiyoshi

【序】生命現象を理解するためには細胞内部にある構造体を分子解像度で三次元イメージングすることが重要となる。しかし、様々な顕微鏡が開発されているが、このようなイメージングは不可能である。例えば蛍光顕微鏡を考えると、1分子の微弱な蛍光から分子解像度を得るには長時間の観測が必要だが、室温では分子が動いてしまうため、分子解像度は実現していない。そこで我々は試料を急速凍結することで分子の運動を止め、高精度に位置決定することを目指してクライオ蛍光顕微鏡を開発している[1]。本講演では二次元検出器を使用して1個の分子の三次元位置を分子解像度で測定できることを、光学シミュレーションによって明らかにしたので報告する。

【XY 方向位置決定】焦平面(XY 平面)方向の位置決定法について示す。図 1(a)が計算に用いた顕微鏡の光学系である。図のように焦平面を XY 平面、光軸方向を Z 軸として定義した。ターゲット分子からの蛍光を反射対物レンズ($f=2.04$ mm)で集め、凹面鏡($f=1,000$ mm)を用いて CCD カメラへ集光した。対物レンズから凹面鏡の距離はそれぞれの焦点距離の和とした($1,002$ mm)。図 1(b)は光子数が 2,500 個のときに得られる蛍光画像のシミュレーションである。これは、光学計算ソフト Zemax によって CCD 上における点像分布関数(PSF)を計算し、光子数 N に応じたポアソンノイズをかけたものである。計算波長は 705 nm とした。この画像に対しガウス関数でフィッティングし、ターゲット分子の XY 位置を決定した。このとき N に対する位置精度 σ_{xy} を図 1(c)に表す(図中の丸)。この計算では 1 点あたり 1,000 回の計算し σ_{xy} を算出した。図から N に対して σ_{xy} は $\sigma_{xy}=133 \text{ nm}/\sqrt{N}$ の式で表すことができ(実線)、この比例定数(133 nm)は報告されている理論式とほぼ一致する[2]。このとき、精度 1 nm を達成する光子数はおよそ 20,000 counts となる。この顕微鏡で想定される第一暗環半径内の光子数は 5,000 counts/sec である。つまり X, Y 方向を 1 nm で決定するのにかかる時間は 4 秒である。これは現実的な時間である。

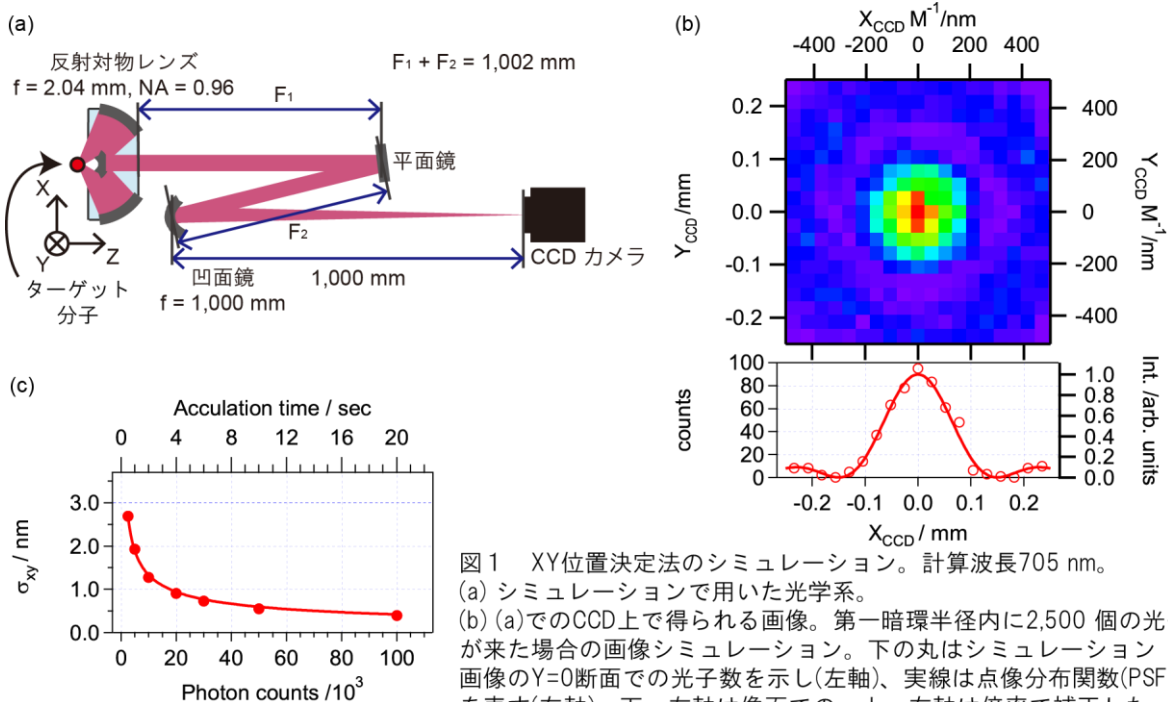


図1 XY位置決定法のシミュレーション。計算波長705 nm。

(a) シミュレーションで用いた光学系。

(b) (a)でのCCD上で得られる画像。第一暗環半径内に2,500個の光子が来た場合の画像シミュレーション。下の丸はシミュレーション画像のY=0断面での光子数を示し(左軸)、実線は点像分布関数(PSF)を表す(右軸)。下・左軸は像面での、上・右軸は倍率で補正したスケールである。

(c) 光子数に対するXY方向の位置精度。上軸はフィッティング領域に1秒あたり5,000個の光子が来たときにかかる測定時間を示す。

【Z方向位置決定法】光軸方向(Z軸)の位置決定法について示す。二次元画像からZ方向の位置を決定するために、ビーム径から求める方法を用いた[3]。しかし、焦点付近ではPSFのビーム径の変化が非常に小さく、Z方向の位置の変化に対して鈍感である(ビームウエストと呼ばれる領域)。そこで焦点距離 $f=5,000$ mm のレンズを凹面鏡の 367 mm($=F_3$) 手前に追加し、蛍光を CCD カメラの手前で集光させ、ぼかした画像を得た(図 2(a))。図 1(a)の系で得られる画像が図 2(b)、図 2(a)の系で得られる画像が図 2(c)である。図 2(c)を見ると同心円状に複数の干渉縞が見えている。これには主に波長に関する情報を含んでいるので、Z方向の位置決定には妨げとなる。干渉縞の空間周波数は高いので、空間的にローパスフィルタの役目を果たすように隣り合ういくつかのピクセルをまとめると図 2(d)の画像ようになる。図 2(d)の画像に対しガウス関数でフィッティングし、スポット幅 s を得た。ターゲット分子の位置を Z 方向に -5 nm から $+5$ nm まで動かしたときにおける s の変化量は、図 2(e)のように 1 次比例していた。よって、幅 s から位置 z が求められることが分かった。N に対しての Z 方向の位置精度 σ_z について、PSF を ZEMAX により計算した。その結果を図 2(f)の丸で示す。このとき N に対しての σ_z は $\sigma_z=707$ nm / \sqrt{N} となり(実線)、比例係数がおおよそ 5 倍大きくなった。これは主に図 2(d)の PSF に対しフィッティングを行ったガウス関数の幅がおおよそ 5 倍大きくなったことが要因である。このとき、精度 1 nm を達成するために必要な、フィッティング領域における光子数はおおよそ $500,000$ counts である。この顕微鏡で想定される全光子数は $12,500$ counts/sec であるため、必要な観測時間は 40 秒となる。これも現実的な時間である。

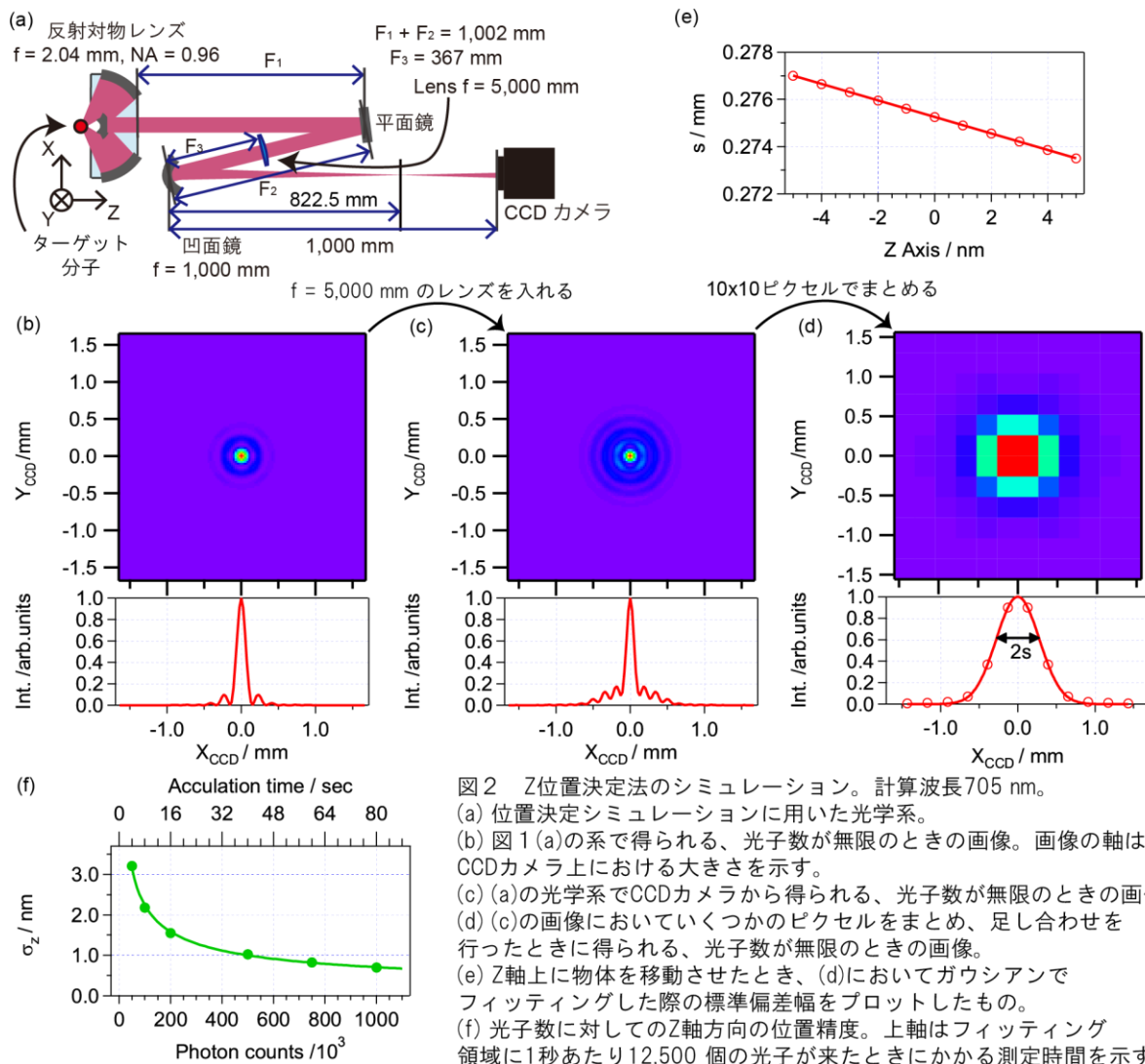


図2 Z位置決定法のシミュレーション。計算波長705 nm。
 (a) 位置決定シミュレーションに用いた光学系。
 (b) 図 1 (a)の系で得られる、光子数が無限のときの画像。画像の軸は CCDカメラ上における大きさを示す。
 (c) (a)の光学系で CCDカメラから得られる、光子数が無限のときの画像。
 (d) (c)の画像においていくつかのピクセルをまとめ、足し合わせを行ったときに得られる、光子数が無限のときの画像。
 (e) Z軸上に物体を移動させたとき、(d)においてガウシアンでフィッティングした際の標準偏差幅をプロットしたもの。
 (f) 光子数に対しての Z 軸方向の位置精度。上軸はフィッティング領域に1秒あたり12,500 個の光子が来たときにかかる測定時間を示す。

【参考文献】

[1] H. Inagawa et al; Sci. Rep. 5, 12833 (2015)
 [2] R. E. Thompson et al; Biophys. J. 82, 2775 (2002)
 [3] H. Pin. Kao and A. S. Verkman; Biophys. J. 67, 1291 (1994)

PDMS マイクロ流路を用いた電気化学計測と可視・赤外分光法の融合的アプローチ
(分子研¹, 総研大², チュラロンコン大学³, IMS-IIPA⁴) 古谷 祐詞^{1,2}, Akkapol Suea-Ngam^{3,4}

Development of PDMS microfluidic devices feasible for on-chip electrochemistry
with visible and IR spectroscopy

(Inst. Mol. Sci¹, SOKENDAI², Chulalongkorn Univ.³, IMS-IIPA⁴)

Yuji Furutani^{1,2}, Akkapol Suea-Ngam^{3,4}

[Introduction] Microfluidic technique is a promising method for characterizing chemical and biological reactions with low sample consumption. Polydimethylsiloxane (PDMS) is transparent under visible light and is a soft material, which widely used for making microfluidic devices feasible for various kinds of experimental techniques. One of the authors published a paper applying FTIR microspectroscopy with a PDMS microfluidic device as a collaborative work with Dr. M. Srisa-Art in Chulalongkorn University, Thailand [1]. In addition, the other research group has developed a droplet-based microfluidics coupled with amperometric detection using chip-based carbon paste electrodes (CPEs) [2]. These researches provided a silver lining for the combination of optical and electrochemical approach in microfluidic device using PDMS as a useful material. We, therefore, planned to combine electrochemical experiment with visible and infrared spectroscopies on a microfluidic chip. Here, we demonstrated visible spectroscopy of electrochemical reactions of silicotungstic acid ($\text{H}_4[\text{W}_{12}\text{SiO}_{40}]$), and infrared spectroscopy of electrochemical reactions of ferrocyanide ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) as a test case.

[Materials & Methods] To fabricate microfluidics devices, T-junction is commonly used for droplet generation pattern. In this work, soft lithography was used as a traditional method for microchip fabrication. Briefly, T-junction microchannel was designed by AutoCAD then printed out as negative film, as shown in Figure 1 (b). After that SU-8, a well-known photoresist polymer, was used for microchannel-pattern fabrication on silicon-wafer.

To fabricate microfluidic devices for visible spectroscopy, PDMS was poured onto the master and left into 65 °C oven for 1 hour, and then peeled out from a master as microchannel of T-junction pattern appears.

Furthermore, a master of electrodes was fabricated using the method as well as using for T-junction's master. To fabricate electrodes, carbon paste which is a mixture of graphite powder, nujol oil, and PDMS (2:1:1, w/w) was filled into pattern channels and clean up with scotch tape Magic™, as illustrated in Figure 1 (c). In order to assemble a microfluidic device, the microchannel plate was undergone into the oxygen plasma and then bonded with the electrode plate immediately. Finally, electric wires were attached onto each electrode using silver paint as a binder, and then covered with epoxy glue for reducing noise and extending life time, as illustrated in Figure 1 (a).

For FTIR microspectroscopy, a spin coater was used to develop a thin PDMS film as

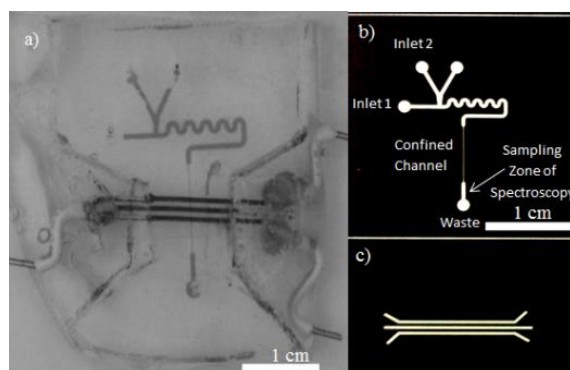


Figure 1 (a) a complete microfluidic device with electric wires (b) microfluidic pattern on negative film with confine channel for droplet extension during pass CPEs (c) Electrode pattern on negative film

reported in the previous paper [1]. The thinner PDMS film was achieved by boned a supporting PDMS plate (5 mm thickness) upon a thin PDMS film (80 μm thickness). This approach successfully prevented a rolling up and laceration of the PDMS sheet. After that, both PDMS films were boned using plasma bonding, and attached electric wires using a method as mentioned above.

To deliver fluid to microchannel, solution was filled into a 1 mL plastic syringe which connected with Teflon tubing and placed onto a syringe pump. Then, the solution was delivered through the tubing connecting to the reservoir at microfluidic channel with infusion mode of syringe pump. For visible detection, the microfluidic device was placed onto a clamp between a light source and a detector. The detection window was set at the end of confined channel. For the IR measurement, the microfluidic device was placed under IR-microscope. The experiment was done through the observation window with rectangular shape (5 mm x 5 mm). Subsequently, electric wires were connected to a potentiostat as working, counter, and reference electrodes, respectively, for both experiments.

Silicotungstic acid and potassium ferrocyanide purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. were dissolved in milliQ water at 0.1-0.5 M and in 0.1 M PBS pH 7.4, respectively. Cyclic voltammetry and amperometry were successfully employed in this work as an electrochemical method for electrochemical behavior and reaction studies, respectively. All electrochemical experiments were performed using a potentiostat (ER461, eDAQ).

[Results] For high-throughput study, droplets were formed by flowing oil (which is a 10:2 (v/v) mixture of perfluorodecalin and 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro-1-octanol), and aqueous solutions into the T-junction as done in the previous report [2]. Visible spectroscopy on electrochemical reduction of silicotungstic acid in droplets, using amperometric approach with -0.8 V applied potential, showed broad visible absorption spectrum in the whole observation range (400-800 nm). This result corresponds to color change of silicotungstic acid from colorless ($\text{H}_4[\text{W}_{12}\text{SiO}_{40}]$) to blue ($\text{H}_5[\text{W}_{12}\text{SiO}_{40}]$) and dark blue ($\text{H}_6[\text{W}_{12}\text{SiO}_{40}]$) solution. The reductions were also confirmed by cyclic voltammograms.

On the other hand, infrared spectroscopy was performed on static condition. First, the microfluidic channel was filled with 0.1 M potassium ferrocyanide solution. Then, the electrochemical reaction was started by applying constant voltage which took place on the working electrode. The applied potential for amperometric method was followed electrochemical behavior from cyclic voltammogram which used from 0 to 0.5 V by fixing each potential for each experiment. After finishing the reaction, the solution was flushed by introducing a same solution using a syringe pump for the next reaction. Consequently, the $\text{C}\equiv\text{N}$ stretching band for ferrocyanide was observed at 2038 cm^{-1} and decreased its intensity in accordance with increase of the applied potential. Concomitantly, the $\text{C}\equiv\text{N}$ stretching band for ferricyanide appeared at 2115 cm^{-1} . The spectral change was more evidently observed between the working and reference electrode, not between the reference and counter electrode. Results indicated electron transfer process of electro- and IR-active species could be observed even through a microchannel which provided a great promise for diminishing of sample consumption as nanoliter scale in spectroelectrochemical approach in further study in near future.

[Acknowledgements]

We would like to thank Ms. Noriko Takada for helping photolithography of a microfluidics master.

[References]

- [1] M. Srisa-Art and Y. Furutani, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **89**, 196-202 (2016)
- [2] A. Suea-Ngam, P. Rattanarat, O. Chailapakul, M. Srisa-Art, *Anal. Chim. Acta.* **883**, 45-54 (2015)

3P097

二次元蛍光寿命相関分光法による

ウマシトクロム *c* のフォールディング機構の研究

(理研・田原分子分光¹、奈良先端大・物質創成²、理研・光量子工学領域³)

○坂口美幸¹、山中優²、廣田俊²、石井邦彦^{1,3}、田原太平^{1,3}

Folding study of horse cytochrome *c* by 2D fluorescence lifetime correlation spectroscopy

(Molecular Spectroscopy Lab. RIKEN¹, Graduate School of Materials Science NAIST², Center for Advanced Photonics RIKEN³)

○Miyuki Sakaguchi¹, Masaru Yamanaka², Shun Hirota²,
Kunihiko Ishii^{1,3}, Tahei Tahara^{1,3}

【序】タンパク質の機能はその立体構造に依存するが、比較的小さなタンパク質の場合、アミノ酸配列をもとに自発的に正しい立体構造(天然状態)が形成される。この過程(フォールディング)の研究はタンパク質の物性を知るうえで重要である。フォールディング機構を研究するには、その過程にあらわれる中間体の構造を決定する必要があり、一分子蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)技術を中心に研究が行われている。当研究グループでは、最近従来の一分子 FRET 実験では計測が困難であったマイクロ秒の時間領域で起こる、比較的速いタンパク質ダイナミクスを観測が可能な二次元蛍光寿命相関分光法(2D FLCS)を開発した^{1,2}。このような FRET に基づく手法でタンパク質全体の構造ダイナミクスを議論する際の問題は、一つの標識サイトより得られる構造情報が限られている点である。そこで本研究では、異なる標識サイトを持つタンパク質を 2D FLCS により研究する事で、タンパク質全体のフォールディングダイナミクスを明らかにする事を目的とした。対象には、フォールディング研究においてモデルタンパク質として知られるウマシトクロム *c* (Cyt*c*)を選んだ。今回の発表ではその一つ目の知見となる、C末端のアミノ酸に蛍光色素を標識した標品についての結果を報告する。

【実験】Cyt*c* のC末端アミノ酸残基であるグルタミン酸 104 をシステイン残基に置換した、E104C 変異体を作製した。そしてそのシステイン残基に蛍光色素、Alexa Fluor 546 (AF546) を標識し試料として用いた。図 1 に Cyt*c* の結晶構造と蛍光標識に用いたアミノ酸残基の位置を示す。測定は酸変性条件 (pH 2.5) で、共

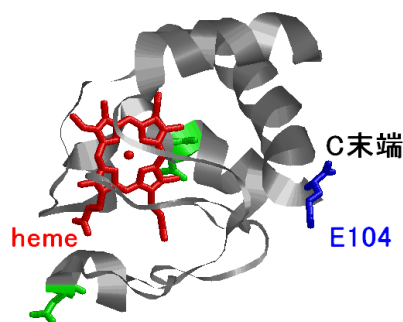


図 1、ウマ Cyt*c* の結晶構造。E104 を青色で、ヘムを赤色で示す。

焦点顕微鏡と時間相関単一光子計数装置を組み合わせた自作の測定装置を用いて行った²。

【結果と考察】 AF546 はドナー、ヘムはアクセプターとして働く。従って AF546 の蛍光寿命はコンパクトに折りたたまれた天然状態では短くなる。一方、変性に伴いヘム-AF546 間の距離が遠くなるにつれて長くなる。図 2 に 2D FLCS より得られた二次元蛍光寿命マップを示す。これは時間 ΔT 離れた二つの光子について解析したもので、

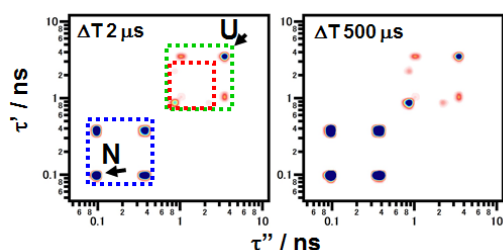


図 2、Cyt c-AF546 の二次元蛍光寿命マップ。

$\Delta T = 2 \mu\text{s}$ を左、 $500 \mu\text{s}$ を右に示す。データは青、赤、緑で示した 3 成分でよく表された。対角線上にあらわれたピークは蛍光寿命で区別されるタンパク質の準安定構造の分布と考える事が出来る。矢印で示した最も短い蛍光寿命を持つピーク

は天然状態 (N)、最も長い蛍光寿命をもつピークは変性状態 (U) と帰属した。また、U と N 以外にいくつかの蛍光寿命分布がみられ、フォールディング過程における中間構造であると推測された。これらの対角線上ピークのクロスピークは、対角線上ピークの相互相関であり、準安定な構造間での交換が平衡化している事を示す。青、赤、緑のいずれも $\Delta T = 2 \mu\text{s}$ で平衡化した二つの蛍光寿命成分をもつアンサンブルであらわされたが、これらの成分間のクロスピークは $\Delta T = 500 \mu\text{s}$ でも現れなかった。この事から、N と U は $2 \mu\text{s}$ より速いタイムスケールで中間状態の一つに構造変化して N アンサンブルと U アンサンブルの状態をとる事、そしてこれらのアンサンブル間の構造変化は $500 \mu\text{s}$ より遅いタイムスケールで起こる事が示唆された。過去の報告より、U 状態から $140 \mu\text{s}$ で C 末端ヘリックスを含む、一部ヘリックス構造を有する中間体が形成され、その後 $\sim\text{ms}$ のタイムスケールで N 状態にフォールドする事が提案されている³。本研究では C 末端を標識した標品を用いたが、U アンサンブルから N アンサンブルへの構造遷移は C 末端ヘリックスが天然状態へ折りたたむ後者のステップを反映していると考えられる。今後は、図 1 に緑色で示した他の 2 か所の部位を標識した標品に関して解析し、タンパク質フォールディングの全体像を研究したいと考えている。

- 1) K. Ishii and T. Tahara *J. Phys. Chem. B*, **117**, 11414 & 11423 (2013)
- 2) T. Otosu K. Ishii and T. Tahara *Nat. Commun.*, **6**, 7685. (2015)
- 3) H. Fazelinia, M. Xu, H. Cheng and H. Roder *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 733 (2014)

3P098

高プロトン親和性 Cookson 型試薬によるステロイド誘導体の
ESI-MS 検出効率に及ぼすプロトン親和力の影響

(東京理大・薬) ○茶谷仁、島田洋輔、小川祥二郎、後藤了

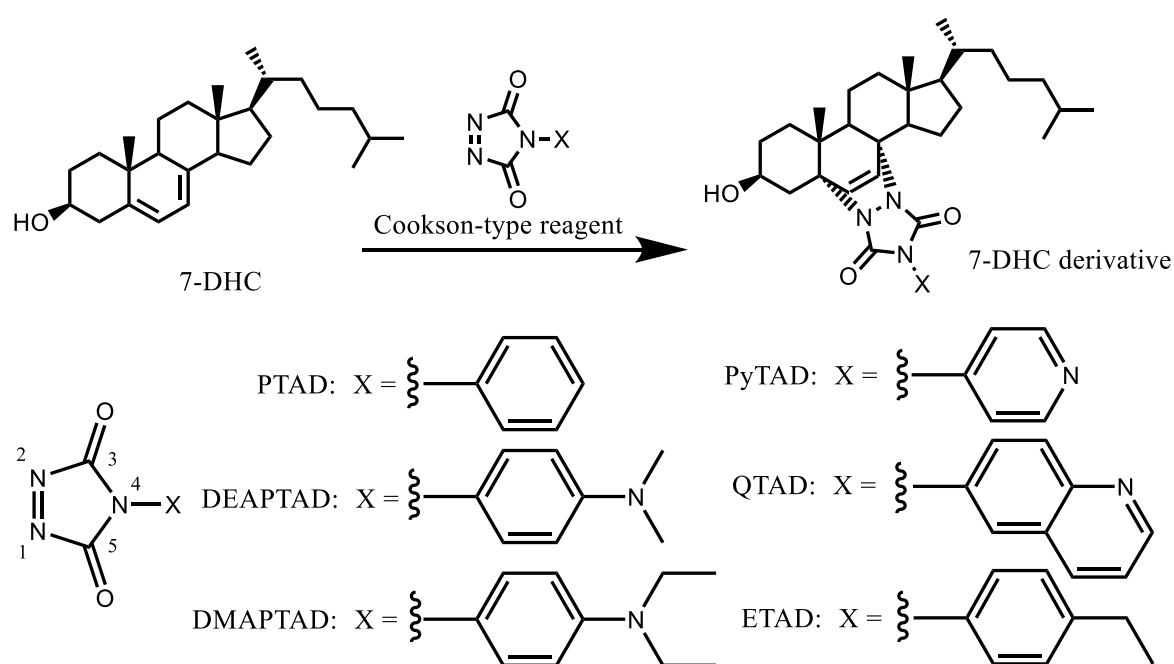
Contribution of the proton affinity in Cookson-type reagents
pretreating the analytes to improve the detection efficiency of steroid
derivatives in ESI/MS analysis

(Fac., Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci.) ○Chatani Hitoshi, Shimada Yohsuke,
Ogawa Shoujiro, Goto Satoru

【背景・目的】

極微量の生体内関連物質の分析には高感度な手法が要求される。ステロイド代謝物は、ESI 応答性が低いものも多く、検出感度向上を目標として様々な誘導体試薬も導入されている。一方、*s-cis*-ジエンを有するステロイド代謝物に対して Diels-Alder 反応により誘導体化する Cookson 型試薬 (1,2,4-triazoline-3,5-dion, Figure 1) が知られるが、測定対象によっては、LC/ESI-MS/MS における検出感度は未だ十分ではない。ESI-MS では主にプロトン付加分子が基準ピークとして得られるため、誘導体の検出感度はプロトン親和力 (PA) と関係すると推察された。^[1]

本研究では、*s-cis*-ジエンを有する化合物として先天奇形症候群である Smith-Lemli-Opitz 症候群 (SLOS) の診断マーカーとされる 7-dehydrocholesterol (7-DHC) をモデルとして用い、Cookson 型試薬に対する ESI-MS/MS による検出限界 (LOD, S/N = 5) と PA の相関を検討し、より検出感度の高い新規 Cookson 型試薬のモデルを考察した。



【方法】

[装置, Waters Premier XE ; カラム, YMC Pack Pro C18 RS ; 移動相, MeOH-10 mM HCOONH₄ (14:1 v/v) ; 流速, 0.2 mL/min] という分析条件で LOD を測定した。

各窒素原子における PA は Gaussian 09 を用いて B3LYP/6-31g(d)による計算を行い構造最適化、振動解析により求めた。これと LOD との相関を回帰分析により検討した。

【結果・考察】

Cookson 型試薬の N1 及び 4-X 基における N 原子の PA 値と LOD の相関は Figure 2, 3 のようになり、相関係数はそれぞれ-0.731, 0.324 であった。各 N 原子の PA を算出した結果、ESI-MS に関わると考えられる部分は分子内で PA が大きく算出された 4-X 基における N 原子である。しかし、予想に反して 4-X 基における N 原子の PA には LOD との相関は認められなかった。強い相関が示された N1 は 7-DHC が誘導体化された際に結合している部分であることが明らかになった。(Figure 1) このことは、N1 の PA 値が誘導体化した際、ESI-MS/MS でのプロトン付加分子と深く関係していることを意味する。

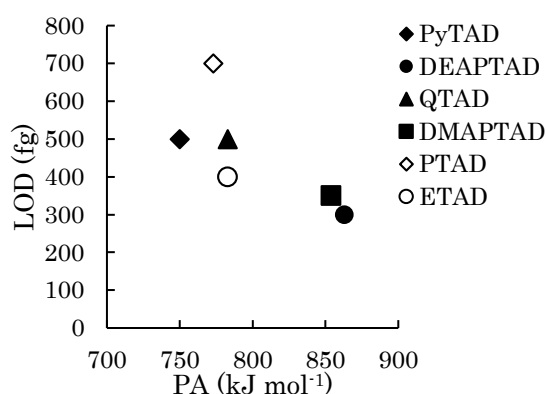


Figure 2. N1 の PA と LOD の相関

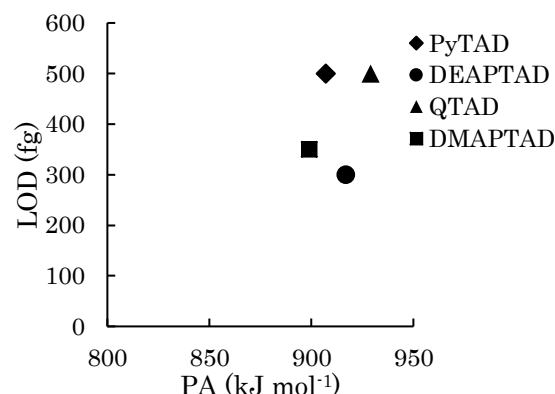


Figure 3. 4-X における N の PA と LOD の相関

次に Cookson 型試薬の 4 位置換基の違いによる N1 の PA の挙動を考察した。*p* 位置換フェニル基について電子吸引基、供与基ごとに算出した PA 値と Hammet 則における σ_p の相関が見出された。(Figure 4)^[2] これは、 σ_p と PA の相関係数は-0.893 となり、 σ_p が小さいと PA は大きくなることを示す。すなわち、Cookson 型試薬は *p* 位置換フェニル基に電子供与性の高い置換基を導入すると検出感度が向上すると考えられる。

【参考文献】

- [1] Ogawa S, Kittaka H, Shinoda K, Ooki S, Nakata A and Higashi T. Biomed. Chromatogr. 2016; 30: 938-945
- [2] Corwin Hansch, Albert Leo and David Hoekman. Exploring QSAR Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. ACS Professional Reference Book. 1995

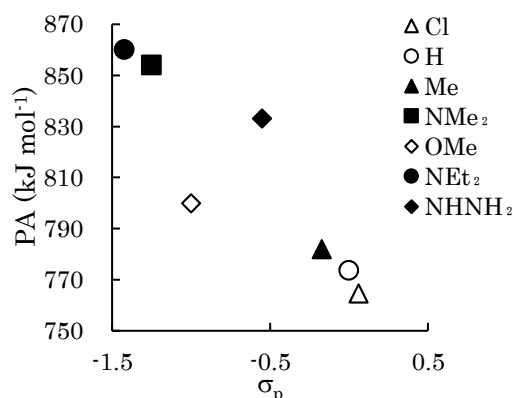


Figure 4. σ_p と PA の相関関係

鉄含有ケルセチンジオキゲナーゼの酸素活性化機構に関する理論的研究

(大阪大院・理¹, 広島市大院・情報科学²)○沼田峻宏¹, 齋藤徹², 川上貴資¹, 山中秀介¹, 奥村光隆¹Theoretical study on O₂ activation by iron-containing quercetin 2,4-dioxygenase(Graduate School of Science, Osaka Univ.¹Graduate School of Information Sciences, Hiroshima City Univ.²)○Takahiro Numata¹, Toru Saito², Takashi Kawakami¹,Shusuke Yamanaka¹, Mitsutaka Okumura¹

【序】

Quercetin 2,4-dioxygenase(2,4-QD)はフラボノイド誘導体の quercetin (Que) の O-ヘテロ環を開裂すると同時に一酸化炭素を放出する金属酵素である[1]。X線結晶構造で判明している活性部位は、中心金属に TypeII の銅、鉄、ニッケルを有しており、それぞれ3つのヒスチジンと1つのグルタミン酸が配位している。酸素分子が活性部位に結合する際、(I)中心金属(M)に攻撃するか、(II)基質(Que)に攻撃するか、実験・理論両方のアプローチで議論されている[2]。我々は、今まで銅含有2,4QD(Cu-QD)に関して、(I)の方がエネルギー的に有利だと提示した。また、(II)の反応で開始しても、alkylperoxo 中間体[Cu-O-O-C(Que)]を必ず経由する事が分かった[3]。Fe-QDの酵素活性はほぼ無く、Cu-QDよりも小さいと報告されている[4]。しかしながら、触媒活性が金属の違いにより大きく異なる理由については明らかでない。

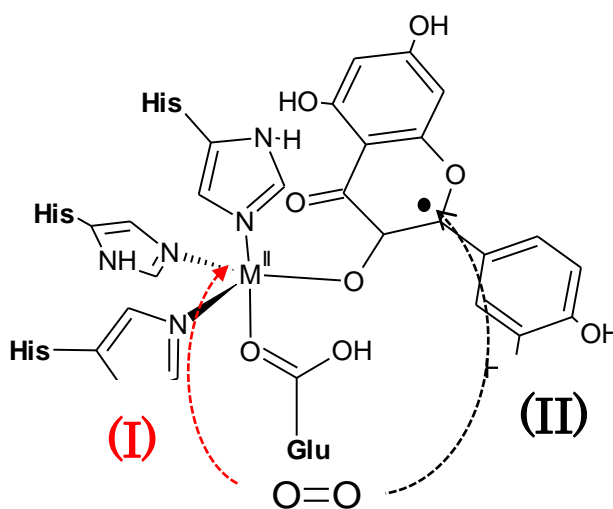


図1 2,4-QD 活性中心における酸素活性化機構 (中心金属 M = Cu, Fe, Ni)

【研究目的・計算】

そこで本研究では、鉄含有 2,4-QD(Fe-QD) (PDB:1Y3T)を計算対象とする。一方 2,4-QD を模倣した人工錯体も複数合成されており、2,4-QD の反応と同等の生成物を与えられると確認されているが、中心金属と反応性の関係では Fe 中心のほうが Cu 中心よりも反応性が高いと報告されている[5]など、酵素とモデル錯体では異なる結果を表している。本研究では、反応性には何が重要な因子であるかどうか提供することを目的とする。Fe-QD の酵素反応の全反応経路を明らかにし、Cu-QD との相違点を示すことにより、中心金属の違いが反応性(反応機構、活性化エネルギー)にどう影響を与えるか検討を行った。図2のような活性部位を切り出したモデルを構築し、計算は Gaussian09 プログラムを使用し、UB3LYP/SVP レベルで構造最適化

を行い、それぞれ停留点においてエネルギーを比較した。

【結果・考察】

最初の酸素分子の結合は、(I)の方がエネルギー的に優位であることが分かった。また酸素分子が Fe^{2+} に攻撃する際、 Fe^{2+} から O_2 に電子移動が起きることで Metal-superoxo 中間体(a)を生成する。(a)から alkylperoxo 中間体(b)を経由し、endperoxide(EP)中間体に至り、生成物(P)を生成する全反応経路が得られた。

Cu-QD で見受けられた(b)から EP に至る前での Glu のカルボキシル基の Que の O3 から O4 への水素結合のスイッチングが、Fe-QD では見られなかった。Glu による本来の働きがないことから、EP 中間体の生成が Fe-QD では困難である。また、活性化エネルギーは、(b)を生成する遷移状態で、26.8kcal/mol を算出し、Cu-QD よりも非常に高い値を示し、このため Cu-QD と異なり、活性を示さないと考えられる。計算結果の詳細は当日報告する。

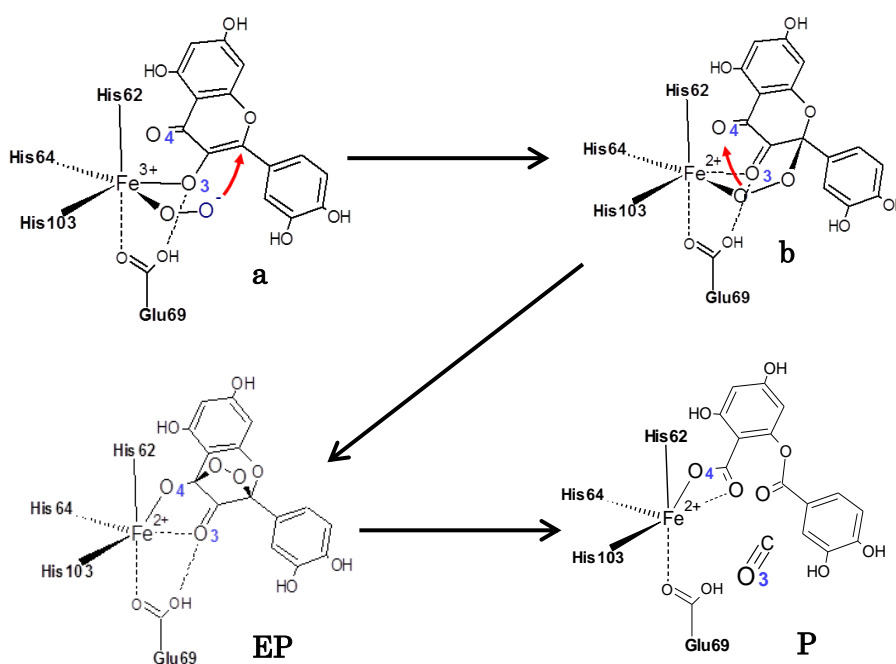


図 2: Fe-2,4-QD の酵素反応における反応経路の詳細

【参考文献】

- [1] R. A. Steiner, K. H. Kalk, B. W. Dijkstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16625, (2002).
- [2] J. S. Pap et al. *Coord. Chem. Rev.* 254, 781 (2010); S. Fiorucci et al. *ChemPhysChem.* 5, 1726 (2004).
- [3] T. Saito et al. *J. Phys. Chem, B* 119, 6952 (2015).
- [4] Matthew R Schaab et al. *Biochemistry* 45, 1009-1016 (2006)
- [5] Ying-Ji Sun et al. *Inorg. Chem*, 52, 10936-10948 (2013)

Ca²⁺依存性糖質結合モジュールの分子認識における カルシウムイオンの役割

(¹九大院理、²琉大理) ○谷本 勝一¹、東 雅大²、吉田 紀生¹、中野 晴之¹

Role of calcium ion in molecular recognition process of calcium-dependent carbohydrate-binding module

(¹Kyushu Univ.; ²Univ. Ryukyus)

○Shoichi Tanimoto¹, Masahiro Higashi², Norio Yoshida¹, and Haruyuki Nakano¹

【序論】 多糖類分解酵素による植物の細胞壁を構成する多糖類(糖鎖)の加水分解は、バイオ燃料生成において重要なプロセスである。この酵素は加水分解を行う触媒モジュールに加えて、触媒モジュールの働きを助ける複数の補助モジュールを有している。それらの補助モジュールの中で、加水分解の際に主要な役割を果たしているものの一つに、糖質結合モジュール(CBM)がある。CBMはセルロースやキシラン等の糖鎖を選択的に結合し、酵素の触媒モジュールの基質認識を助ける働きをもっており、その働きは酵素の加水分解能を向上させることが知られている^{[1], [2]}。そのため、CBMによる糖鎖結合の詳細なメカニズムを解明することで、天然のものよりも分解能を向上させた多糖類分解酵素を設計するための知見が得られると期待されている。

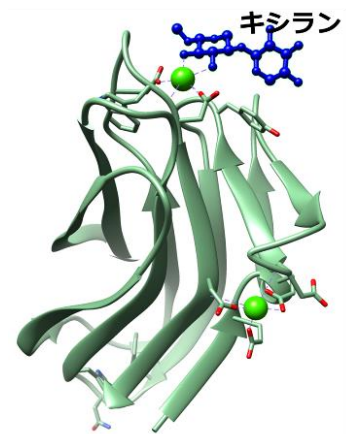


図 1: CBM36 の PDB
結晶構造
(緑色の球体:Ca²⁺)

CBMは現在 70 種類以上のファミリーに分類されており、それぞれのファミリーはモジュールの形状に応じて異なる糖鎖選択性をもつ。本研究では、CBM36 というファミリーに着目し、研究を行った。このファミリーは結合サイトに Ca²⁺が存在すると、キシランを選択的に認識するという特異な性質をもつ(図 1)。CBM36 は Jamal-Talabani らによって発見された最初の Ca²⁺依存性 CBM であり、その構造及び分子認識の特性については明らかにされているが^[3]、キシラン結合の分子論的メカニズム及びキシラン親和性に対するイオン種依存性については依然として未解明なままだった。そこで、本研究では、MD シミュレーションと 3D-RISM 法を用いた自由エネルギー解析を行い、キシラン結合のメカニズム及びキシラン親和性に対するイオン種依存性の解明を目的として研究を行った。^[4]

【計算方法】 CBM36 の初期構造として、PDB 結晶構造(1ux7)を用いた。この結晶構造は結合サイトに Ca²⁺とキシロトリオース(xylotriose; キシロースの三量体。キシランはキシロースの多量体であり、キシロトリオースはキシランの鎖長が短いものに相当する)を結合している。この初期構造を基に、(1)結合サイトの Ca²⁺を Mg²⁺に置換した系(CBM36-Mg²⁺-xylotriose)、(2)初期構造からキシロトリオースを取り除いた系(CBM36-Ca²⁺)、(3)1 からキシロトリオースを取り除いた系(CBM36-Mg²⁺)、(4)キシロトリオースのみ(only xylotriose)の四種類の系を構築し、初期構造も含めた五種類の系の水中における構造サンプリングおよびエネルギー計算を、定温定圧 MD シミュ

レーションにより行った。次にサンプリングした構造に対して 3D-RISM 法を適用し、溶媒和自由エネルギーと溶媒分布を計算した。得られた自由エネルギー変化に対し、成分分解解析を行った。

【結果と考察】 結合サイトに Ca^{2+} または Mg^{2+} を結合した場合の結合サイトへのキシロトリオース結合にともなう自由エネルギー変化図を図 2 に示す。 Ca^{2+} 結合時にはキシロトリオースの結合により系全体の自由エネルギーが減少した。また、自由エネルギー変化の成分分解解析の結果から、 Ca^{2+} と結合に関与するキシロトリオースのヒドロキシ酸素間の静電相互作用が結合の駆動力となることが分かった。次に Mg^{2+} 結合時にはサンプリング中にキシロトリオースが結合サイトから離れてしまい、またキシロトリオースの結合にともない系全体の自由エネルギーが増加した。この結果から、 Mg^{2+} 結合時には CBM36 はキシラン親和性をもたないことが示された。成分分解解析の結果から、 Mg^{2+} 結合時には Ca^{2+} 結合時よりもキシロトリオースの結合による溶媒和自由エネルギーの変化量が 20 kcal mol^{-1} 以上も高くなった。これは、溶媒和自由エネルギーの成分中の溶質(CBM36・ Mg^{2+} ・キシロトリオース)-溶媒(水)間の相互作用エネルギーの顕著な増加に起因する。すなわち、 Mg^{2+} 結合時にはキシロトリオースの結合にともなう脱水和によるエネルギー増加量が、CBM・ Mg^{2+} とキシロトリオース間の相互作用増加によるエネルギー減少量を大きく上回ったため、結果的に系全体の自由エネルギーが増加したことを示している。以上の結果から、キシラン結合の親和性に対するイオン種依存性は、結合サイトにあるイオンの脱溶媒和による自由エネルギーの損失とイオン-キシラン間の静電相互作用による利得との差に主に起因することが分かった。詳細な内容は当日発表する。

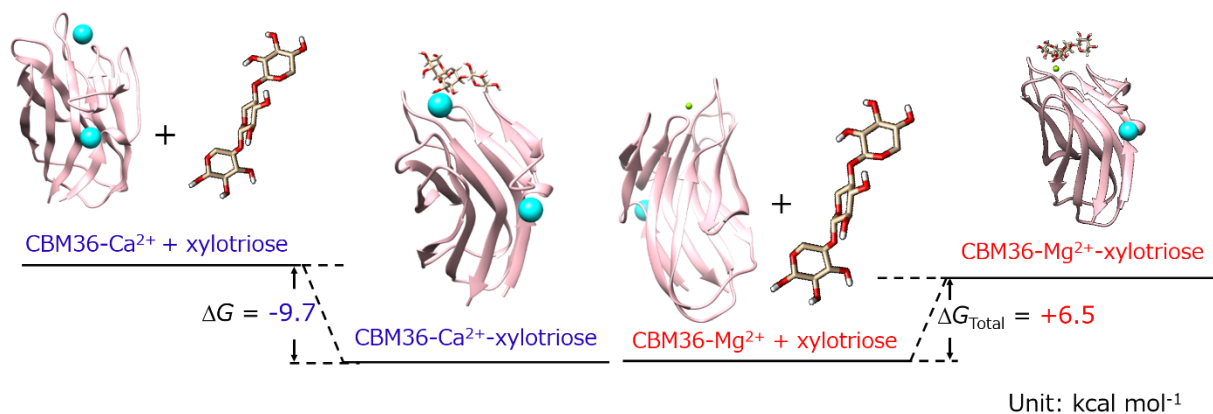


図 2: Ca^{2+} 結合時(左)と Mg^{2+} 結合時(右)のキシロトリオース結合による自由エネルギー変化図

- [1] Bolam D. N., Ciruela A., McQueen-Mason S., Simpson P., Williamson M. P., Rixon J. E., Boraston A., Hazlewood G. P., and Gilbert H. J. *Biochem. J.*, **331** (Pt 3), (1998) 775.
- [2] Din N., Damude H. G., Gilkes N. R., Miller R. C., Jr., Warren R. A., and Kilburn D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, (1994) 11383.
- [3] Jamal-Talabani S., Boraston A. B., Turkenburg J. P., Tarbouriech N., Ducros V. M., and Davies G. J. *Structure*, **12**, (2004) 1177.
- [4] Tanimoto S., Higashi M., Yoshida N., and Nakano H. *J. Phys. Condens. Matter*, **28**, (2016) 344005.