



PCCP 「複雑分子系研究」特集号発刊

田原 太平（理研、領域代表）

英國王立化学協会（Royal Society of Chemistry, RSC）が発行する物理化学の国際学術誌 Physical Chemistry Chemical Physics (PCCP) で Complex Molecular Systems: Supramolecules, Biomolecules and Interfaces の特集号が発刊になりました。ゲストエディターを田原、北尾、水谷、神取、藤井の5名の総括班員が務めていることからわかるように、これは我々の新学術領域「柔らかな分子系」が推進してきた複雑分子系研究の特集号として企画されたものです。

新学術領域研究では5年間の研究成果のまとめを何か具体的な形で残すことが求められます。例えば、研究成果について班員の方々に英語の総説を書いていただき、それをまとめた本を出版することなどが考えられます。我々はこのような方法も考えましたが、それを選択することはしませんでした。それはこのような本を出版しても現在では広く読まれる可能性はほとんどなく、新学術領域の単なる「アリバイ」作りになってしまふことを恐れたからです。われわれの領域では運営ができるだけ直球で実質的で意味のある形で行おうと努力してきました。ですので、それと矛盾しない形で研究のまとめを行いたいと強く思ったのです。

我々は良い研究ができたら必ず論文を書きます。そこで我々が論文を出したいと思うような一流国際紙で特集号が組めれば、皆が無駄な労力を使わず、最も良い形で強い国際発信ができるはずです。ただし特集号を組むことの雑誌側のメリットは、そうすることによって論文数を増やし、雑誌の質を上げることにあるので、すでにそれらを満たしている高いレベルの雑誌で特集号を組むことはそれほど容易ではありません。幸い顔の広い事務局の藤井正明さんが英國王立化学協会の日本担当の方と知己で、そのつてを使って PCCP で特集号を組む可能性を RSC に打診することができました。PCCP のインパクトファクターは 4 を越えますので、我々がこれだと思う研究の論文を出すのに十分なレベルの学術誌だと考えました。

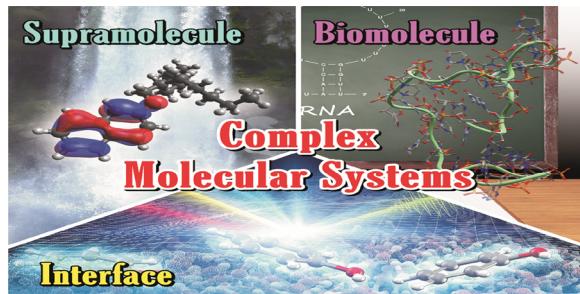
PCCP からは特集を組むに当たって幾つか条件が出されました。まずは質の高い論文が数多く集まること、そして日本だけでなく多くの国からの投稿があること。これは RSC 側としては当然の要求で、さらに言えば、本当の意味で国際発信できる特集号を組めるか、を問

われたということでした。もちろん大丈夫だと言って、PCCP から OK をもらいました。

大見得を切ったものの、内心少々心配でした。しかし実際に蓋を開けてみると、皆さんの協力のおかげで、ゲストエディターが連名で書いた巻頭言を入れて計 51 もの論文が掲載される例外的とも言える大部な特集号となりました。さらに領域外の様々な国の研究者による論文も 11 報掲載され、まさに「柔らかな分子系」で推進してきた複雑分子系研究の流れを国際的な潮流に発展させる起点となりうる特集号になりました。

この特集号へ投稿された論文に対しては、PCCP への通常の投稿論文と全く同じ査読・審査が行われ、我々は全く関与していません。審査基準は厳しく、かなりの数の論文が掲載に至りませんでした。また、「柔らかな分子系」が含む研究領域は広いので、これを全部カバーする専門学術誌はありません。そこで今回 PCCP という物理化学の専門誌で特集号を組みましたが、特に創成班の班員の方にとって論文を投稿しにくかったと思います。実際、質の高い論文を投稿していただいたにも関わらず、PCCP のスコープに合わないという理由で掲載されなかった論文もありました。この点に関しては心からお詫びしたいと思います。

PCCP では、表表紙の外側、内側、裏表紙の外側、内側と 4 つのカバーがあり、毎号ここに図を出せる 4 つの論文が選ばれます。この特集号ではこのすべてに「柔らかな分子系」での共同研究の成果による論文が選ばれました。これは異なる背景を持つ研究者が集まって始まった我々の新学術領域研究が、5 年の間に融合を果たして新しい学術領域が作られ、世界発信ができたことを表しています。これを実現にしてくださった班員の皆様に心から御礼申し上げたいと思います。



Complex Molecular Systems 特集号の TOC



業績紹介：DNA および RNA ヘアピンループの構造的差異と生物学的機能の起源

Jacob B. Swadling (東工大生命理工・研究員)
石井 邦彦 (理研・A02 計画研究分担者)
田原 太平 (理研・A02 計画研究代表者)
北尾 彰朗 (東工大生命理工・A01 計画研究代表者)

論文題目："Origins of biological function in DNA and RNA hairpin loop motifs from replica exchange molecular dynamics simulation"

著者 : Jacob B. Swadling, Kunihiko Ishii, Tahei Tahara, and Akio Kitao

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 2990-3001 (2018).

この研究は、田原グループが開発した二次元蛍光寿命相關分光法(2D-FLCS)を用いて進めてきた研究に、北尾グループの分子シミュレーションを加えることで、DNA および RNA ヘアピンループの構造的な差異を主に温度依存性および時間相関から解明しようという共同研究プロジェクトの成果の一部である。本論文は、ループの両端に結合した色素間距離に対応する情報が FRET により得られることを念頭に、主にシミュレーションによって得られた成果を発表したものである。

ヘアピンループは、一本鎖 DNA あるいは RNA によって形成され、鎖の両末端にある塩基対によって形成されるステムと、不対塩基を有するループからなる短い二次構造である(図 1)。ヘアピン構造は、自然界に見出されるリボザイム(RNA 酵素)やメッセンジャー RNA などの重要なビルディングブロックとなる二次構造である。本研究では、DNA ヘアピンと RNA ヘアピンの構造形成と安定性における違いを解明するために、これらが取り得る立体構造を大規模な温度レプリカ交換分子動力学法で網羅的に探索した。局所的には、persistent length の温度依存性は DNA・RNA とともに小さいが、persistent length 自体は RNA の方が長い。一方、全局的には図 2 で示したように、DNA と比較して RNA の方が、熱転移温度が高い。また、室温では DNA と比較して RNA はより折り畳まれた狭い構造分布をとり、DNA は比較的広がった構造分布をとることも明らかになった。RNA は、DNA よりも 2 倍の分子内水素結合を形成しており、これがより高い融点をもたらす原因の一つであると考えられる。このように RNA

の方が、全局的にはコンパクトになりやすいことは、RNA がリボザイムなどにおいて酵素機能を可能にする複雑な三次構造を安定に形成するために重要であると考えられる。また、DNA が構造をより大きく変化させられることは、配列情報の読み取りや対合を可能にするなどの機能を発揮するために必要であると示唆される。

Volume 20 Number 5 | February 2018 | Pages 2917–3852

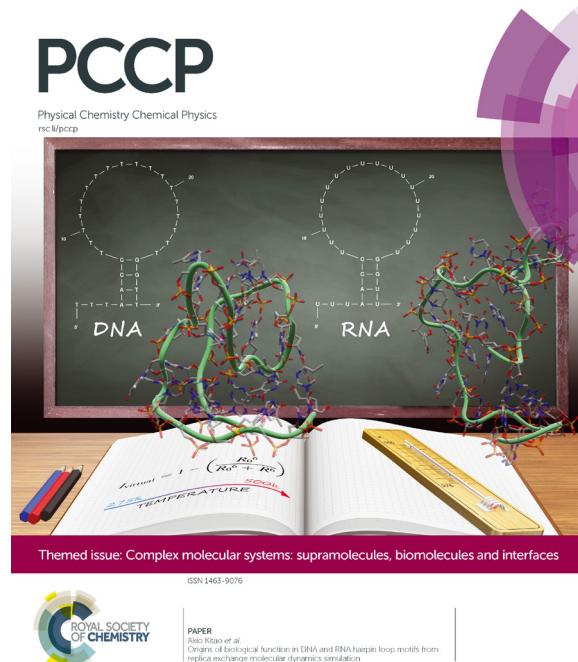


図 1 *Phys. Chem. Chem. Phys.*誌のフロントカバー。研究に用いた塩基配列と代表的な立体構造が示してある。

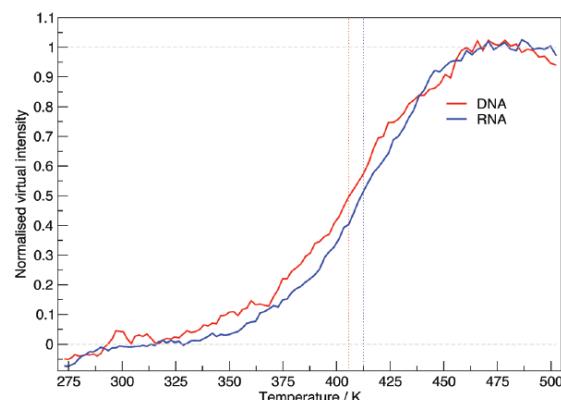


図 2 FRET 強度に換算した場合の DNA および RNA の熱転移曲線。



業績紹介：SFG 分光における 3 次感受率の効果とは？ — 荷電した水界面の分子動力学シミュレーションによる研究

城塚 達也 (東北大理・A01 計画研究分担者)
森田 明弘 (東北大理・A01 計画研究代表者)

論文題目："Effect of Third-Order Susceptibility in Sum Frequency Generation Spectroscopy: Molecular Dynamics Study in Liquid Water"

著者 : T. Joutsuka, T. Hirano, M. Sprik, and A. Morita*

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3040-3053 (2018)

和周波発生 (SFG) 分光は二次の感受率 ($\chi^{(2)}$) を通して界面層に存在する分子を選択的に観測できる。しかし、電極・溶液のような荷電した界面では、電荷のつくる電場が液体内部に浸透して、分子が配向することによる新たなシグナルが生じる。これは三次 ($\chi^{(3)}$) の寄与とみなされ、表面層よりも厚い拡散層からの信号となって、SFG の界面選択性にも影響する。そのため荷電した界面を SFG 分光で観測するためには $\chi^{(3)}$ の寄与を差し引かなくてはいけない。実験的に $\chi^{(3)}$ の寄与を直接求めることは不可能で、これまで Gouy-Chapman 理論などで界面ポテンシャル Φ をモデリングすることにより、 $\chi^{(3)}$ の寄与を見積もってきた。しかしながら、この解析にはモデルの精度に大きく依存する曖昧さが含まれていた。分子動力学 (MD) シミュレーションは SFG スペクトルの分子的起源を解明することができるので、本研究は MD シミュレーションにより $\chi^{(3)}$ の効果を直接計算して検証する。我々の研究グループではこれまで SFG スペクトルを実験と比較しうる精度で計算・解析する理論体系を構築してきたの

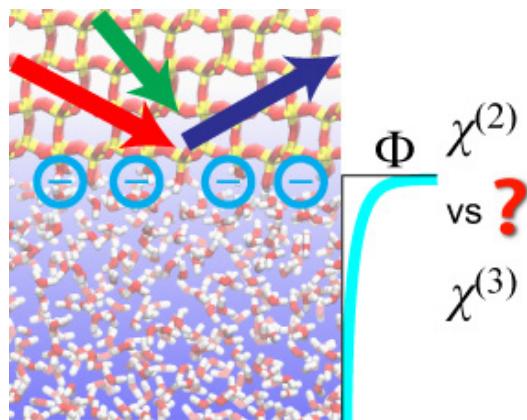


図 1 荷電したシリカ・水界面における SFG 分光。

で、これを用いて $\chi^{(2)}$ と $\chi^{(3)}$ の寄与を同精度で比較することに成功した。

まず、 $\chi^{(3)}$ をバルク水に電場をかけることにより計算した。得られた $\chi^{(3)}$ のスペクトル (図 2 黒線) はバルク水の IR や Raman などのスペクトルに類似しており、その線形は実験で見積もられたもの[1]と一致した。

次に、得られた $\chi^{(3)}$ をシリカ・水界面 (図 1) に適用した。この界面は溶液の pH が上昇すると表面のシラノール基が脱プロトン化して界面が負に帯電するため $\chi^{(3)}$ 効果が重要となる。得られた $\chi^{(3)}$ を脱プロトン化したシリカ・水界面に適用すると、界面とバルクの成分

(図 2 赤線と黒線) が明瞭に分けることができるることを示した。この時、界面ポテンシャル Φ の計算が必要となるが MD シミュレーションでは直接計算することができるため界面のモデルを仮定する必要がない。また、得られた SFG スペクトルは実験結果[2]の線形を再現することを確認した。

本研究により MD シミュレーションを用いて $\chi^{(3)}$ を直接計算できることを示した。これは理論計算の持つアドバンテージであり、提唱された計算手法は汎用的なので今後普及していくと考えている。得られた $\chi^{(3)}$ を用いた SFG スペクトルの解析手法もまた他の荷電した固液界面に広く応用されると期待できる。

引用文献

- [1] Y.-C. Wen et al. *Phys. Rev. Lett.* **2016**, 116, 016101.
[2] A. Myalitsin et al. *J. Phys. Chem. C* **2016**, 120, 9357.

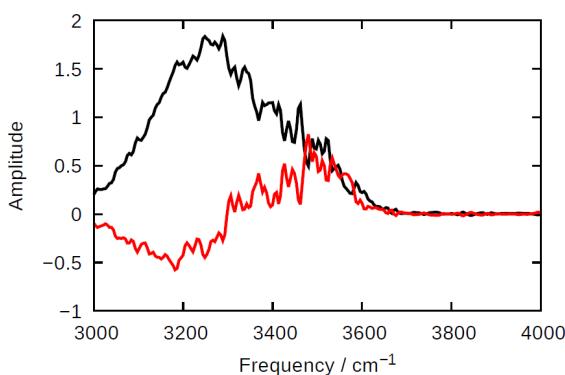


図 2 荷電したシリカ・水界面における SFG スペクトルの界面成分 (赤) と拡散層成分 (黒)。

業績紹介：液体ホルムアミドにおける分子間に亘る電子の挙動と遠赤外スペクトルの強度の解析

鳥居 肇 (静岡大学・A01 公募研究代表者)

論文題目："Intermolecular Charge Fluxes and Far-Infrared Spectral Intensities of Liquid Formamide"

著者 : Hajime Torii

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3029–3039 (2018).

液体や生体分子系など、凝縮相系の低振動数スペクトル [遠赤外 (THz), ラマン] は、その構造やダイナミクスの性質を測る強力な手法である。しかし、スペクトルに含まれる情報を最大限利用するためには、強度生成メカニズムについての理解が不可欠である。バンド幅が広く相互の重なりが大きい低振動数領域では、なお一層である。遠赤外 (THz) スペクトルは、系の双極子の時間相關関数をフーリエ変換したものから決まるため、系内の全ての荷電粒子の動きが関わる。そこで、水素結合系においては、水素結合のダイナミクスに誘起される電子密度の変調が、重要なファクターとなる。以前の研究 [*J. Phys. Chem. B* **115**, 6636 (2011); *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 1219 (2014)] では、液体の水を対象とした理論解析から、 $\sim 6 \text{ THz}$ ($\sim 200 \text{ cm}^{-1}$) に現れるバンドの強度が、主として水素結合距離の変調(分子の運動自由度としては分子並進)によって起こる電子密度の分子間の移動(分子間電荷フラックス)に由来するものであることを、明らかにした。本研究では、広く興味が持たれている水素結合性液体のもう一例として、液体ホルムアミドの場合をとりあげた。

液体を対象とした計算に先立って、まず 3 種の 2 量体を対象に、分子並進・回転に関わる双極子微分の水素結合形成による変化を密度汎関数法によって計算したところ、水素結合方向の成分が主であることが分かった。上述した水の場合とは異なり、典型的な水素結合状態にある分子でも、分子回転に関わる双極子微分が水素結合形成によって増大する。電子密度微分(孤立分子の値を差し引いたもの)を見てみると(一例を図 1 に示す)、双極子微分の増大が分子間電荷フラックスに由来していることが分かる。

そこで、6 種の 30 量体について、分子並進・回転に関わる双極子微分の水素結合形成による変化を計算し、水の場合と同様の分子間電荷フラックスモデルでの再

現を試みたところ、相関係数 0.88 から 0.91 となる良好な一致が得られた。そこから得られる分子間電荷フラックスの様子を模式的に示したのが、図 2a である。水の場合とは異なり、酸素原子の位置が分子重心 (X) から大きく外れているため、この酸素原子が関わる水素結合距離が分子回転によって大きく変化する。また、当該分子が供与する水素結合 H...O の向きも X...H の向きとは(近似的でも)同じとは言えないため、この水素原子が関わる水素結合距離も分子回転によって大きく変化する。これが、ホルムアミドの場合には、分子回転に関わる双極子微分が水素結合形成によって増大する理由である。そして、分子間電荷フラックスの効果を取り入れたスペクトル計算の結果は、 $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$ に大きな強度を持つ(図 2b) という点で、実測をよく再現している。

今後、生体分子と水の相互作用系などを包含した形で、THz スペクトルと構造・ダイナミクスの相互関係に対する理解が進むことが望まれる。

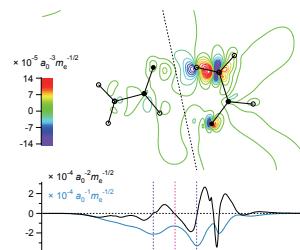


図 1 : ホルムアミド 2 量体における分子回転に関わる電子密度微分の一例。

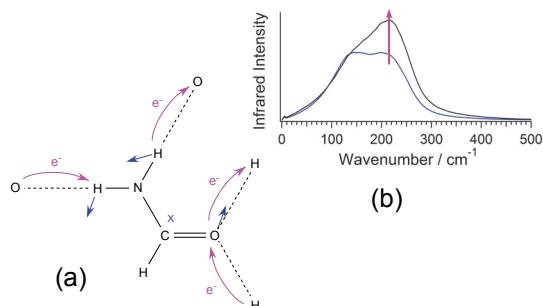


図 2 : (a) 水素結合を形成したホルムアミドの分子回転に伴う分子間電荷フラックスのスキーム。(b) 分子間電荷フラックスの効果による液体ホルムアミドの遠赤外スペクトルの形状変化。



業績紹介：テルビウム錯体の発光強度を「消光の活性化障壁」から理論的に説明・予測することに成功

畠中 美穂 (NAIST, JST さきがけ・A01 班友)
長谷川 美貴 (青山学院大・A03 班友)

論文題目："Computational study on the luminescence quantum yields of terbium complexes with 2,2'-bipyridine derivative ligands"

著者 : Miho Hatanaka, Ayato Osawa, Tomonari Wakabayashi, Keiji Morokuma, Miki Hasegawa

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3328-3333 (2018).

テルビウムイオン (Tb^{3+}) は、紫外光を吸収する“適切な”配位子を持つことで、4f-4f遷移に起因する緑色発光を示す。“適切な”配位子として広く用いられている分子の一つに 2,2'-ビピリジン (bpy) がある。長谷川グループは、bpy 二分子を架橋した分子（図 1 の L1）を合成し、L1 を配位子とする Tb^{3+} 錯体の発光を調べた。すると、低温条件・固相中では強い緑色発光を示したが、室温条件下では、固相中でも液相中でもほとんど光らなかった。[1] 低温条件で緑色に光ったということは、L1 は紫外光を吸収し、そのエネルギーを Tb^{3+} に渡すことができたことを意味する。では、なぜ室温下ではほとんど光らなかつたのだろうか？

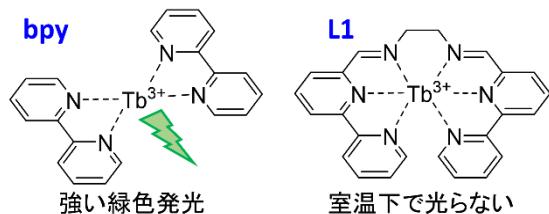


図 1. bpy と L1 を配位子を持つ Tb^{3+} 錯体

この理由を明らかにするために、畠中オリジナル近似（エネルギーシフト法[2,3]）を用いて、発光・消光におけるエネルギーと構造の変化を理論的に調べた。 Tb^{3+} 錯体の発光・消光過程は、一般に図 2 のヤブロンスキーノードで説明される。強い発光を示すためには、次の三つの条件を満たすことが必要である。

- (i) 配位子の T1 のエネルギーが Tb^{3+} の 5D_4 より高い
 - (ii) T1 → 5D_4 の EET(図 2 の(3))の活性化障壁が小さい
 - (iii) T1 → S0 の ISC(図 2 の(6))の活性化障壁が大きい
- これらのエネルギーについて、エネルギーシフト法を用いて見積もったところ、配位子が bpy の場合は条件

(i)～(iii)全てを満たしていたのに対し、配位子が L1 の場合は(i)しか満たしていないかった。特に(iii)の活性化障壁がほとんどないため、室温下では発光よりも消光が速く進行してしまい、 Tb^{3+} からの発光が起こらないと分かった。

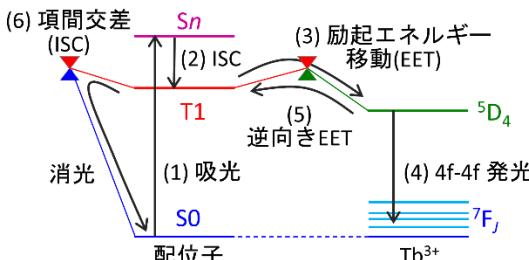


図 2. Tb^{3+} 錯体の発光・消光過程

本計算の最大のメリットは、図 2 の過程における分子構造の変化を可視化できることだ。T1 から ISC(図 2 の(6))への構造変化から、(iii)の活性化障壁が小さい理由が L1 のアズメチル部分の C-H 面外変角振動にあると突き止めることができた。発光しない原因がアズメチル部分にあるなら、これを取り除けば強く光るのではないか？そこで、アズメチル部分を還元型アズメチルやエーテルに変えた Tb^{3+} 錯体の計算を行ったところ、条件(i)～(iii)を満たすことが分かった。つまり強発光体になり得ることを理論的に予測することができた。

理論的配位子設計ができた！！と思った畠中グループは、意気揚々と長谷川グループに結果を伝えたのだが、実は長谷川グループでも類似の配位子を合成し、その Tb^{3+} 錯体が強い緑色発光を示すことを見出していたのだ。[4] 今回の一件から、理論的配位子設計が可能になりつつあることを確信した。今後の課題は計算時間の短縮である。計算時間を短縮し、高速なバーチャルスクリーニングを可能にすることで、新しい発光材料の発見の加速に貢献していきたい。

引用文献

- [1] M. Hasegawa, et al. *New J. Chem.* **38**, 1225 (2014).
- [2] M. Hatanaka, K. Morokuma, *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 4184 (2014).
- [3] M. Hatanaka, Y. Hasegawa, K. Morokuma, et al. *Chem. Sci.* **8**, 423 (2017).
- [4] S. Ogata, M. Hasegawa, et al. *New J. Chem.* **41**, 6385 (2017).



業績紹介：polytheonamide B チャネルの力場作成と溶媒ダイナミクスの解析

森 俊文 (分子研・A01 公募研究代表者)

論文題目："Structure and dynamics of solvent molecules inside the polytheonamide B channel in different environments: a molecular dynamics study"

著者 : Mahroof Kalathingal, Takashi Sumikama, Toshifumi Mori, Shigetoshi Oiki, and Shinji Saito

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3334-3348 (2018).

Polytheonamide B (pTB)チャネルは、海綿から抽出された水素イオンチャネルであり、48 残基からなる小さなタンパク質である。pTB は水やイオンが一列で通れるだけの細孔（直径 4Å）を持ち、単分子で 40Å ほどの長さであり、自発的に脂質二重膜に侵入しチャネルを形成するため、強力な細胞毒性を示す。そのため、薬理学的な興味からも、その構造や特性は実験で広く調べられてきた。pTB は D 体、L 体のアミノ酸が交互に並ぶ β -ヘリックス構造という特殊な構造を持つ。これらの標準的ではないアミノ酸は既存の古典力場には含まれておらず、これをシミュレーションで取り扱うには新たに力場を作る必要があるため、理論的研究はこれまであまり行われていなかった。そのため、pTB のイオン透過の分子機構は明らかになっていない。

本研究では、pTB の構造特性や、イオンの透過機構を理論的手法から明らかにすることを目標に、分子力場の開発とその評価を行い、さらに、異なる環境下における pTB チャネル内の溶媒分子のダイナミクスを分子動力学シミュレーションによって調べた。

まず、pTB に含まれる、6 つの標準的でないアミノ酸および末端の残基について、Amberff14SB 力場とともに使うための力場セットを開発した（図 1）。さらに、この力場を用いて、クロロホルム-メタノールの 1:1 混

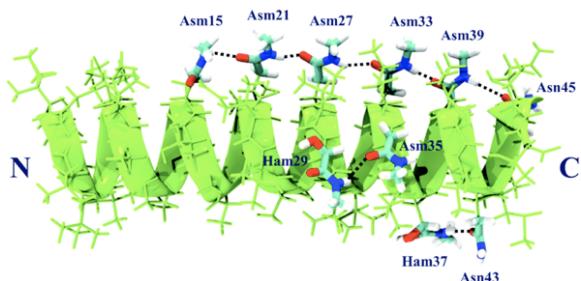


図 1: pTB タンパク質の β -ヘリックス構造と、今回新たにパラメータを決定したアミノ酸。

合溶液中でのシミュレーションを行い、NMR で得られている構造などと比較して力場を検証したところ、よい一致が得られた。

次に、この力場を用いて、水溶液、クロロホルム-メタノールの 1:1 混合溶液、および POPC リン脂質二重膜中における pTB の分子動力学シミュレーションを各々 2 μs 実行し、pTB の構造揺らぎやチャネル内の溶媒分子の分布や配向を調べた。

その結果、 β -ヘリックス構造はどの環境下でも安定的に保持されているものの、水中や混合溶媒中では N 末端の大きな揺らぎが見られた。この傾向は NMR の実験でも確認されており、pTB の持つ特徴的な側鎖-側鎖間水素結合が溶媒との間に水素結合に置き換わることによって、ヘリックスが若干曲がることによる。一方で、POPC 中では pTB の構造揺らぎは小さかった。

また、pTB の細孔内の溶媒分子の振る舞いを比較したところ、水分子は水同士および細孔に沿った pTB の水酸基の酸素との間に安定な水素結合ネットワークを形成していた（図 2）。これは、細孔内の水分子が同じ方向を向いて並び、一分子ずつずれることでチャネル内を移動していくことを示唆している。さらに、水溶液中と比べ、POPC 中において、水分子がより強く配向しており、強く運動して動いていることが確認された。このような動きは pTB チャネルをイオンが透過する上で重要である。一方で、混合溶媒中では、水素結合ネットワークが弱くなり、かつ細孔内のメタノール分子の強く運動した動きはあまり見られなかった。

今回開発した pTB の古典力場を用いることで、pTB チャネルの細孔内のイオン透過過程のダイナミクスを詳細に調べることができると期待され、現在その方向で研究を進めている。

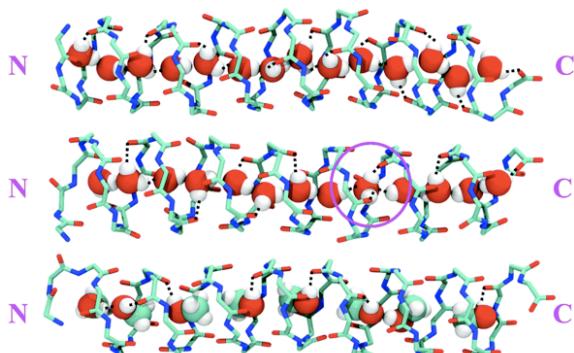


図 2: (a)水、(b)POPC、および (c)混合溶媒中における pTB チャネルの細孔内の溶媒分子の位置と配向。



業績紹介：ヒト血清アルブミンへの単糖類の結合構造の理論的解析

森 俊文（分子研・A01 公募研究代表者）

論文題目："The critical role of dimer formation in monosaccharides binding to human serum albumin"

著者：Prapasiri Pongprayoon and Toshifumi Mori

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3249-3257 (2018).

ヒト血清アルブミン（HSA）は、血清中に多く存在するタンパク質の一つであり、アミノ酸や疎水性脂肪酸、薬物など多くの低分子物質と吸着して、これらを血中で運搬する役割を果たす。また、HSA は血中のグルコースなど還元糖と非酵素的に糖化反応を起こす。糖化は HSA の機能を損なうため、様々な病気を引き起こすと考えられているが、同時にこれは血糖値のマーカーとして用いられることがある。HSA はこのように多彩な機能を持つため、構造や薬剤の結合部位に関する研究が多数報告されているが、糖化の起こる部位や、その構造については、まだ不明な点が多い。

近年、グルコースが結合した HSA の結晶構造が報告され、直鎖状と環状の異なった構造を持つ 2 つのグルコース分子が一つの結合サイト（Sudlow site I）に結合しているのが発見された [1]。一方で、他の結合サイト（Sudlow site II）に糖分子が結合するという報告もあり、また分子動力学（MD）シミュレーションからは、2 つの糖分子が近接した、及び離れた位置に結合している 2 つの構造が提案されている[2]（図 1）。また、グルコース以外の糖分子がどのように結合するのかについては、あまり理解が進んでいない。そこで、本研究では、グルコースに加え、ガラクトースが糖化反応の前にどのように HSA に結合するかを調べることで、糖の違いによる結合様式の違いを検討した。

まず、過去の MD シミュレーションで得られたグルコースとの複合体構造をもとに、ガラクトースの結合

構造と結合エネルギーを、自由エネルギー摂動法により求めた。その結果、ガラクトースの結合構造が 2 つ得られ、またどちらの場合もグルコースの方が HSA に強く結合していた。これは過去の実験から示唆される傾向と一致しており、水酸基の向きの違いが結合エネルギーに大きな影響を与えることを示している。

次に、これらの結合状態から各々の構造について、200 ns ずつ MD シミュレーションを行い、HSA の構造や糖分子の位置がどう揺らいでいるか調べた。すると、2 つの糖分子が離れた位置に結合している初期構造からのシミュレーションでは、グルコース、ガラクトースとともに、環状構造の糖が結合サイトから解離していく過程が見られ、この結合状態は十分に安定ではないことが示唆された。一方で、2 つの糖分子が初期構造において近接しているときには、糖分子間に水素結合が形成されつつ、HSA の Sudlow site I に結合していた。

本シミュレーションより、グルコース、ガラクトースと HSA の間の水素結合ペアは一定でなく、かつ結合ポケットの中で動いているのが見られた。それに対して、糖分子間の水素結合は強い。これらの結果は、単糖類が、HSA の Sudlow site I の大きな結合ポケットの中で安定に結合するためには、一分子では小さすぎるため、二量体として存在していることを示唆している。

また、糖化反応が起こるリジン残基と糖分子の間に恒常的な結合は見られなかったが、構造が揺らぐ中で過渡的に水素結合が形成されていた。よって、糖化反応は、このような構造揺らぎの中から適切な構造をとるときに進行していくことが予想される。

引用文献

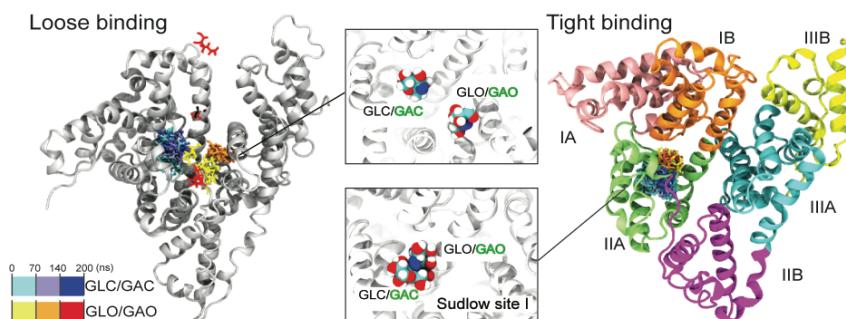
[1] Y. Wang *et al.*, *J. Biol. Chem.* **288**, 15980-15987 (2013).[2] T. Awang *et al.*, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **35**, 781-790 (2016).

図 1: 直鎖状および環状構造のグルコース (GLC と GLO) 又はガラクトース (GAC と GAO) が HSA に、離れて（左）、および近接して（右）結合している構造。糖分子が近接して二量体構造をとることで、大きな結合サイトに強く結合する。



業績紹介：Ar-PtCO の振動スペクトルにおける異常な希ガス効果を解明

八木 清（理研・A01 公募研究代表者）

論文題目："Fundamental peak disappears upon binding of a noble gas: a case of the vibrational spectrum of PtCO in an argon matrix"

著者：Y. Ono, K. Yagi, T. Takayanagi, and T. Taketsugu.

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3296-3302 (2018).

低温 Ar マトリックス法で得られた PtCO の振動スペクトルを図 1 (青) に示す。PtCO は直線 3 原子分子で 4 つの振動モードを持ち、観測された 3 つのピーク ($2052, 581, 917 \text{ cm}^{-1}$) はそれぞれ CO 伸縮振動 [$\nu(\text{CO})$]、PtC 伸縮振動 [$\nu(\text{PtC})$]、2 重縮退した PtCO 変角振動 [$\nu(\text{PtCO})$] に帰属された[1]。一見、何の問題もない綺麗なスペクトルだが、 $\nu(\text{PtCO})$ の帰属が後に論争になる。

近年、小野ら[2]は MCO 分子 (M=Ni, Co, Pd, Pt) と Ar 原子の複合体に対する高精度電子状態計算を実行し、Ar-M 間の結合力は典型的な van der Waals 力より遥かに強いことを示した。さらに、驚くべきことに、PtCO の $\nu(\text{PtCO})$ は 416 cm^{-1} と計算され、Ar マトリックス法の $\nu(\text{PtCO})$ と大きく異なった。同時に、岡林らは気相で PtCO の測定に成功し、 $\nu(\text{PtCO})$ は 420 cm^{-1} と報告した[3]。気相実験と理論計算はよく一致した。

それでは、Ar マトリックス法で得られた 917 cm^{-1} の振動バンドは何なのか？Ar と PtCO が強く結合することで $\nu(\text{PtCO})$ の高波数シフトが予想されるが、ArPtCO の $\nu(\text{PtCO})$ は 461 cm^{-1} と計算され、 917 cm^{-1} には程遠い。このバンドの起源は長い間謎だった。

本研究では、高精度電子状態計算により非調和ボテン

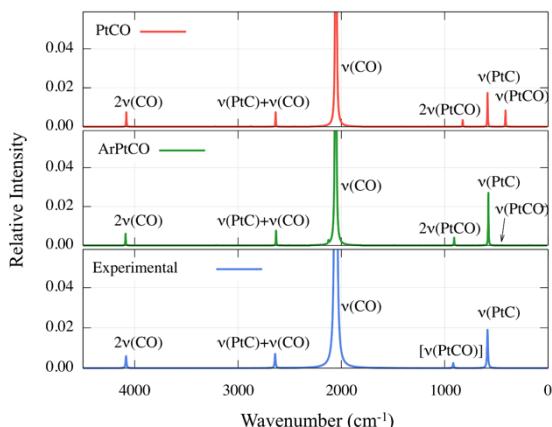
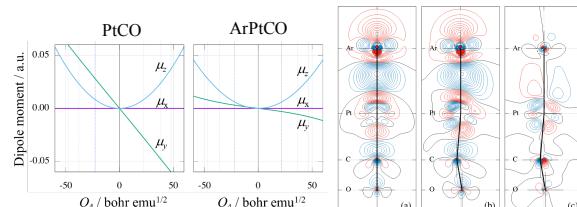


図 1. VCI 計算による PtCO (赤)、ArPtCO (緑) の振動スペクトルと低温 Ar マトリックスで得られた PtCO のスペクトル (青) [1]。

ンシャル (CCSD(T) レベル) と双極子 (CCSD レベル) を生成し、振動 CI (VCI) 法を用いて、振動スペクトルを計算した。図 1 に示すように、 917 cm^{-1} の振動バンドは $\nu(\text{PtCO})$ の倍音であることが分かった。注目すべきことに、PtCO で見える $\nu(\text{PtCO})$ の基音のピークが ArPtCO では消失している！「基音は許容遷移で、倍音を含むそれ以外は禁制遷移」は物理化学のどの教科書にも載っている基本である。計算結果は ArPtCO が常識を覆す異常な分子であることを示唆している。

そこで原因を丁寧に調べた。図 2 に Ar 付加による PtCO の双極子と電子密度の変化を示す。基音と倍音の吸収強度はそれぞれ双極子の傾き (1 次微分) と曲率 (2 次微分) で与えられる。図 2 から、 μ_z は曲率が大きく、Ar 付加の影響をほとんど受けないことが分かる。従って、倍音吸収は PtCO と ArPtCO で同様に起こる。一方、傾きは μ_y が支配的である。これは、変角振動により CO 基が分子軸から離れ、y 方向に双極子が誘起されるためである。この μ_y の傾きが Ar 付加により顕著に小さくなる。さらに、電子密度を調べることで、ArPtCO では CO 基が誘起した双極子を打ち消すように Pt の電子が再配置することが分かった。そのため、分子全体の双極子変化が小さくなり、ArPtCO では $\nu(\text{PtCO})$ の基音が消失する。



単純な分子にも関わらず、 $\nu(\text{PtCO})$ の帰属が論争となつた原因是、Ar 付加により「柔らかく」なる Pt の電子が引き起こす異常な赤外吸収パターンにあった。本論文はレフリーから "... a beautiful computational study that solves an experimental conundrum." と絶賛され、PCCP HOT Articles に選ばれた。

参考文献

- [1] L. Manceron et al., *J. Phys. Chem. A*, 2000, **104**, 3750.
- [2] Y. Ono and T. Taketsugu, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, **385**, 85; Y. Taketsugu et al., *Chem. Phys. Lett.*, 2010, **484**, 139.
- [3] T. Okabayashi et al., *J. Phys. Chem. A*, 2011, **115**, 1869.



業績紹介：四次構造を保ったもとでのヘモグロビンの三次構造ダイナミクス

水野 操 (阪大院理・A02 計画研究分担者)
石川 春人 (阪大院理・A02 計画研究分担者)
水谷 泰久 (阪大院理・A02 計画研究代表者)

論文題目："Tertiary dynamics of human adult hemoglobin fixed in R and T quaternary structures"

著者：Shanyan Chang, Misao Mizuno, Haruto Ishikawa, and Yasuhisa Mizutani

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3363-3372 (2018).

タンパク質の機能は、分子内に含まれる複数の機能部位が互いに運動的に働くことによって生み出される。例えば、ガスセンサーフタンパク質では、ガス分子がタンパク質に結合すると、結合部位に構造変化が生じ、その変化が触媒部位の構造を変化させ酵素活性の制御がなされる。このような複数の機能部位が運動している性質はアロステリーとよばれるもので、そこではタンパク質の構造変化が本質的に重要な役割を果たす。

アロステリーが機能に本質的な役割を果たす典型例がヘモグロビンの協同性である。ヒトヘモグロビンは赤血球に含まれる酸素運搬体タンパク質で、 α および β サブユニットが 2 つずつ会合した四量体構造をとっている。酸素などのガス分子リガンドの結合・脱離によって、R 構造および T 構造とよばれる 2 種類の四次構造を切り替える。ヘモグロビンの酸素運搬に重要な性質は協同的酸素親和性であり、その発現機構の理解には、四次構造変化と三次構造変化のカップリングを解明することが必要である。われわれは、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、サブユニット間相互作用が三次構造変化の速度に及ぼす影響を明らかにした。

本研究で用いたヒトヘモグロビン試料は、サブユニット相互作用部位にある残基を置換した 2 種類の変異体 (β サブユニット Asp99→Asn および β サブユニット Asn102→Thr) である。これらの置換はそれぞれヘモグロビンの四次構造を R 構造および T 構造に安定化することが知られている。本研究では、これらの変異体と野生型の時間分解共鳴ラマンスペクトルを比較し、四次構造を保ったもとでの三次構造ダイナミクスについて議論した。

われわれは、リガンド結合状態のヘモグロビン試料を作製し、それにパルス光を照射することによってリガンドを脱離させ、その後の構造変化を時間分解可視

共鳴ラマン分光法によって調べた。リガンドの脱離により、野生型ヘモグロビンにはまず三次構造変化が起こり、その後 R 構造から T 構造への四次構造変化が起きる。時間分解共鳴ラマンスペクトルには、ヘム由来のラマンバンドが観測され、これらは時間とともに強度および波数が変化した。観測されたラマンバンドの中でわれわれは、ヘム鉄とそれに配位したヒスチジン残基間の伸縮振動 [$\nu(\text{Fe}-\text{His})$] バンドに着目した。それは、このバンドの振動数がヘモグロビンの高次構造に敏感であるからである。

β D99N 変異体 (R 構造をとる変異体) では、リガンド脱離に伴い振動数の低下が観測され、その時間的振る舞いは 10 μs までは野生型の振る舞いと一致した。しかし、10 μs 以降では野生型がさらに低波数側へのシフトを示したのに対し、変異体では振動数の変化は見られなかった。このことは、 β D99N 変異体では三次構造変化のみが起きていることを示しており、この変異体が T 構造への遷移を示さないことをコンシスティントである。一方、 β N102T 変異体 (T 構造をとる変異体) では、10 ns から 100 μs にわたる観測領域すべてにおいて異なる時間的振る舞いを示した。これらの結果は、三次構造変化が四次構造変化に強く依存することを示している。

われわれは上記の実験結果に主に基づき、ヘムとサブユニット間相互作用部位との間で、EF ヘリックス (ヘムを保持しているヘリックス) を介した双方向的な原子変位の伝播が起きていると結論した。

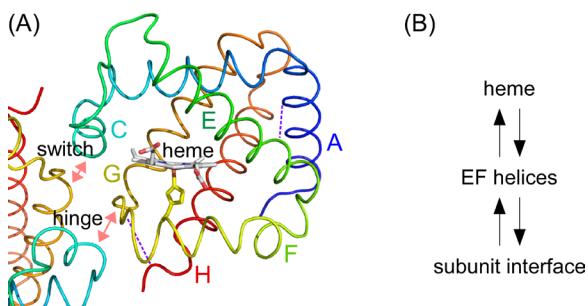


図 1. (A) ヘモグロビンサブユニットの模式図。紫色の破線は A-E ヘリックス間および F-H ヘリックス間の水素結合を表す。ピンク色の矢印はサブユニット間相互作用部位を表す。(B) ヘモグロビンに観られる、ヘム-サブユニット相互作用部位間の双方的な原子変位の伝播。スイッチ領域が形成するサブユニット間相互作用が三次構造変化に影響を及ぼすことを本研究は明らかにした。



業績紹介：フェノール存在下での空気/水界面の構造 -ヘテロダイン検出振動和周波発生分光および MD シミュレーションによる研究-

日下 良二（理研, A02 計画研究連携研究者）
石山 達也（富山大学, A01 計画研究分担者）
二本柳聰史（理研, A02 計画研究連携研究者）
森田 明弘（東北大学, A01 計画研究代表者）
田原 太平（理研, A02 計画研究代表者）

論文題目：“Structure at the air/water interface in the presence of phenol: a study using heterodyne-detected vibrational sum frequency generation and molecular dynamics simulation”

著者 : Ryoji Kusaka, Tatsuya Ishiyama, Satoshi Nihonyanagi, Akihiro Morita and Tahei Tahara

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, 20, 3002.

空気/水界面は環境中、例えば、大気中のエアロゾル表面や海水表面などに広く存在し、地球環境を左右する重要な化学反応が空気/水界面で起こっている。環境中には多くの界面活性な有機化合物が存在するため、実際に空気/水界面で起こっている化学反応の機構を理解するためには、これらの有機化合物が空気/水界面に与える影響を明らかにすることが重要になってくる。本研究では、環境中に存在する有機化合物の例としてフェノールを選び、ヘテロダイン検出振動和周波発生(HD-VSFG) 分光、および、MD シミュレーションによって、フェノールの存在する空気/水界面の構造を明らかにした。その結果、フェノールは、単純かつ中性な有機分子であるにも関わらず、空気/水界面の構造に大きな影響を与えていていることを見出した。

図 1 に HD-VSFG 分光により測定した、OH 伸縮振動領域における、空気/水-フェノール界面（フェノール水溶液の表面）の $\chi^{(2)}$ スペクトルの虚部($\text{Im}\chi^{(2)}$)を示す。フェノールの濃度に依存して、スペクトルの形が大きく変化する結果を得た。この結果は、フェノールの存在により、空気/水界面の構造が大きく変化していることを示唆している。重水を用いた実験や MD シミュレーションにより得られたスペクトル解析などによって、観測されたバンドを以下の通りに帰属した。(1) 3620 cm^{-1} の正のバンド：フェノールの芳香環と OH $\cdots\pi$ の水素結合を形成した水の OH 伸縮振動、(2) 3200 cm^{-1} をピークとする 3100-3500 cm^{-1} の負のバンド：フェノールの OH を受容して、水素結合を形成した水の OH

伸縮振動、(3) 3090 cm^{-1} の負のバンド：フェノールの芳香環の CH 伸縮振動、(4) 3000 cm^{-1} 以下のプロードな負のバンド：フェノール OH 伸縮振動。これらのバンドの帰属に対応する、空気/水-フェノール界面の構造の概略図を図 2 に示す。水の水素結合構造が、純水界面と大幅に異なることを見出した。即ち、空気/水界面にフェノールが吸着されるに伴って、(1) フェノールの芳香環と OH $\cdots\pi$ の水素結合を形成した水と、(2) フェノールの OH を受けて水素結合を形成し、自身の OH 基を下に向けた水が出現する。

フェノールは、中性で非常に単純な分子であるにも関わらず、界面の水と特徴的な水素結合を形成することによって、空気/水界面の構造に大きな影響を与えることを本研究によって見出した。環境中に存在する有機化合物は、空気/水界面の構造を大きく変化させ、その結果として、空気/水界面で起こる化学反応に影響を与えている可能性を指摘することができる。

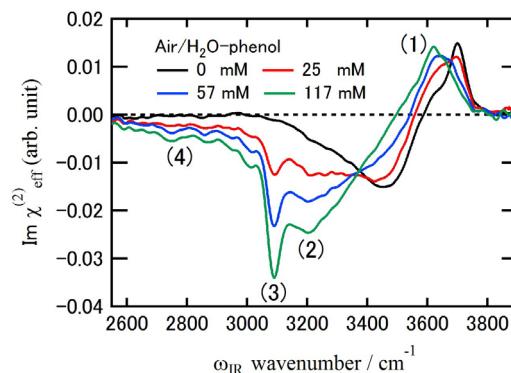


図 1. HD-VSFG により得た、フェノール水溶液表面の $\text{Im}\chi^{(2)}$ スペクトル。水溶液中のフェノールの濃度を図中に示している。

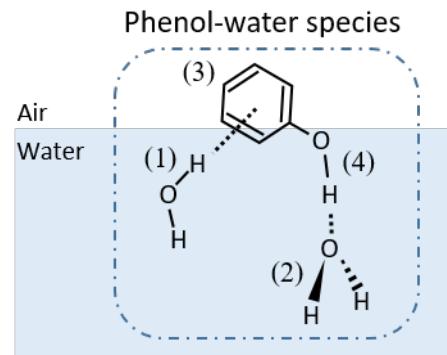


図 2. 空気/水-フェノール界面の構造の概略図



業績紹介：ライン共焦点光学系とハイブリッド光検出器によるマイクロ秒分解一分子 FRET 測定

小井川 浩之(東北大・A02 計画研究連携研究者)
高橋 聰 (東北大・A02 計画研究代表者)

論文題目："Microsecond resolved single-molecule FRET time series measurements based on the line confocal optical system combined with hybrid photodetectors"

著者：Hiroyuki Oikawa, Takumi Takahashi, Supawich Kamonprasertsuk and Satoshi Takahashi

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3277-3285 (2018).

我々は、これまでにライン共焦点光学系とマイクロ流路フローセルを組み合わせることで、 $100\text{ }\mu\text{s}$ の時間分解能で一分子の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効率の時系列をミリ秒間取得できる装置を開発した。この装置を用いて、小タンパク質であるプロテイン A の B ドメイン(BdpA) やユビキチンの変性状態には、ミリ秒の時間スケールの遅いダイナミクスが存在し、タンパク質の変性状態は、これまで考えられてきたよりも、不均一な構造集団であることを明らかにした[1-2]。

我々の装置では、試料溶液をフローセル中に導入し続けながら、比較的強い強度で励起することによって、一分子から 10000 counts/ms 以上の蛍光光子を検出できる。従って、光子数だけから考えると、 $10\text{ }\mu\text{s}$ 以下の時間分解能で一分子の FRET 効率を追跡することも可能なはずである。ところが、これまでの装置では、EM-CCD カメラを用いて、流路を流れる一分子のライン状の軌跡を撮影していたため、時間分解能の改善には、流速を増加させる必要があり、一分子当たりの観測時間が短くなる欠点があった。具体的には $10\text{ }\mu\text{s}$ の時間分解能では観測時間は $200\text{ }\mu\text{s}$ 以下であった。

この問題を解決するため、本論文では検出器としてハイブリッド光検出器(HPD)を導入した。HPD は光電陰極とアバランシェダイオードを組み合わせた光子計数検出器で、高感度と良好な時間応答性を持つことが特徴である。軌跡の画像撮影ではなく、HPD に入射した光子数をリアルタイムに記録することで、流速によらず時間分解能改善が可能である。また、直径 3mm という比較的大きな検出領域を持つため、EM-CCD を代替するには都合がよい。しかし HPD への変更は良いことばかりではなく、次の二つの課題があった。

一つ目の課題は、EM-CCD から HPD に変更した場合、これまでカメラ上の各ピクセルに分散していた背景光が一つの検出器に入射するため、結果的に背景光の影響が大きくなることである。本論文では、この課題を解決するため、一分子からの蛍光の検出を阻害せずに背景光を除去することができる最適な検出スリット幅を実験によって調べ、 $10\text{ }\mu\text{m}$ と決定した。

二つ目の課題は、10000 counts/ms 以上の高頻度で検出器に到達する光子をもれなく数え上げるために、HPD の高い時間応答性に加えて、その出力パルスを高速で計数できるカウンターが不可欠であることである。そこで、本論文では汎用の 80MHz カウンター、時間相関一光子カウンター、800MHz 高速光子カウンターの三種類の光子計数システムを用意し、HPD を組み込んだ装置からの信号をカウントした。800MHz 高速カウンター以外の 2 種類のカウンターでは、深刻な数え落としが発生した。一方、800MHz 高速カウンターでは、10000 カウント/ms 以上の光子計数においても光子計数の線形性が保たれていた。そのため、HPD とともにこのカウンターを用いれば、十分高速な光子計数が可能であることが分かった。

以上の改良によって、二重蛍光ラベルされた BdpA 一分子の FRET 効率を $10\text{ }\mu\text{s}$ の時間分解能で 5 ms 間追跡することができた(図)。これは、報告されている類似手法の中で、もっとも短い時間分解能である。今後、開発した装置を用いて、タンパク質折り畳みにおけるダイナミクスの一分子追跡を行う予定である。

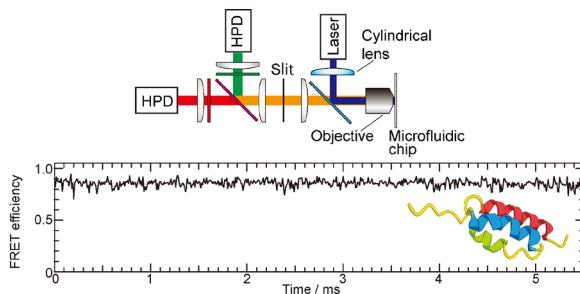


図 HPD を組み込んだライン共焦点一分子蛍光測定装置(上図)と一分子 BdpA の FRET 効率時系列(下図)

引用文献

- [1] H. Oikawa *et al.* *J. Phys. Chem. B* **119**, 6081-6091 (2015).
- [2] M. Saito *et al.* *J. Phys. Chem. B* **120**, 8818-8829 (2016).



業績紹介：5-ヒドロキシインドールカチオンのミクロスコピック水和構造の赤外分光による研究

宮崎 充彦（東工大化生研・A02 計画研究分担者）
藤井 正明（東工大化生研・A02 計画研究代表者）

論文題目："Sequential microhydration of cationic 5-hydroxyindole (5HI^+): infrared photodissociation spectra of $5\text{HI}^+ - \text{W}_n$ clusters ($\text{W} = \text{H}_2\text{O}$, $n \leq 4$)"

著者：Johanna Klyne, Mitsuhiro Miyazaki, Masaaki Fujii, and Otto Dopfer

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20(5)**, 3092–3108 (2018).

本研究では、5-ヒドロキシインドール - 水クラスターイオン ($5\text{HI}^+ - \text{W}_n$) の水和ネットワーク構造の発展を気相赤外分光と DFT 計算によって研究した。水和は OH 基を主としながら、NH 基についても生じることがわかった。論文では、既に報告している無極性分子による溶媒和[1]との比較も考察している。

気相孤立状態における溶媒和クラスターに対する分光測定は、溶媒数、溶媒和構造、溶媒配向などの詳細な情報を溶質分子に直接配位する分子だけに注目してその分子間相互作用を実験的に調べる直接的な手段を与える。凝縮系における測定では溶質と直接相互作用しない大量の溶媒分子の妨害のため、直接の（いわゆる第一溶媒和圏）溶質 - 溶媒相互作用を選択的に研究することは依然困難である。そのため、分子間相互作用の詳細な理解、および量子化学計算との比較を考える上で、依然重要な意味を持っている。

5HI はインドールに水酸基を置換した分子であり、セロトニンなどの骨格をなすなど、生体系でも使われる分子である。一つの分子内にインドール環を挟んで反対側に NH 基と OH 基を持つため、二つの酸性水素結合サイトによる水和部位の競合がどのように水和構造に影響を及ぼすかに興味が持たれる。

図 1 に得られた赤外スペクトルと DFT 計算によって得られた構造を示す。 $n = 1$ では、 $3000\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ にプロードな水素結合 XH 伸縮振動が観測され、併せて $3400\text{--}3600$ に自由 XH 伸縮振動が観測される。この自由 NH/OH 伸縮振動の強度比から、 5HI^+ の最初の水和はより酸性度の高い OH 基に優先的に起こることがわかる。バンド強度と安定化エネルギーの計算値から、OH 基の水和は NH 基に比べ約 10 倍水和されやすい。

一方、 $n = 2$ の赤外スペクトルには、自由 XH 伸縮振動がほとんど観測されない。これは、2 つ目の水分子が主として (>90%) 一つ目の水分子が配位していない方の XH 基へ配位し、水水間の結合を持つ第二溶媒和圏の形成は 3 つ目の水分子を待つ必要があることを示している。 $n = 3$ では、自由 XH 伸縮振動が完全に消失し、代わって 3700 cm^{-1} に水分子の自由 OH 伸縮振動が現われることから、 5HI^+ の OH、NH 基が共に水和された上で第二溶媒和圏が水分子間の水素結合によって形成されることを示している（すなわち三つの水分子が連なる水和は存在しない）。この際、OH 基に水和した水分子に次の水分子がへ都合するタイプが優勢であり、NH 基に水 - 水の水和が生じる確率は、やはり 10% 程度である。

これらの結果を無極性分子による 5HI^+ の溶媒和と比較すると、はじめ 2 分子まで OH および NH 基を溶媒和することは共通だが、三つ目以降の振る舞いに違いがみられる。水和においては、水 - 水間の水素結合がイオンの存在によって強められるため、水分子のネットワークが発達する。一方、無極性分子では溶媒間の相互作用が弱いため、 π 電子運との相互作用が優先的であり、より均一に 5HI^+ を取り囲むように溶媒和が生じることになる。

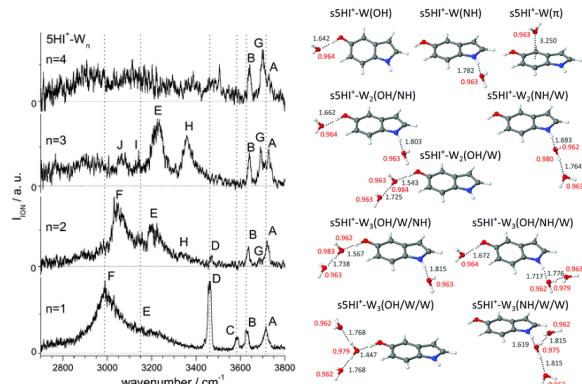


図 1. $5\text{HI}^+ - \text{W}_n$ ($n \leq 4$) の赤外スペクトルと DFT 計算によって得られた構造。

引用文献

- [1] J. Klyne and O. Dopfer, *J. Mol. Spectrosc.* **337**, 124 (2017); [2]



業績紹介：5-ヒドロキシインドール-水クラスターのイオン化誘起異性化反応の時間分解赤外分光による実時間観測

宮崎 充彦（東工大化生研・A02 計画研究分担者）
藤井 正明（東工大化生研・A02 計画研究代表者）

論文題目："Real-time observation of the photoionization-induced water rearrangement dynamics in the 5-hydroxyindole-water cluster by time-resolved IR spectroscopy"

著者：Mitsuhiko Miyazaki, Ayumi Naito, Takamasa Ikeda, Johanna Klyne, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya, Otto Dopfer, and Masaaki Fujii

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20(5)**, 3079–3091 (2018).

本研究では、5-ヒドロキシインドール - 水クラスター (5HI-W) のイオン化に伴う水分子の水和再配向メカニズムを気相孤立状態におけるナノ秒時間分解赤外分光によって研究した。イオン化に伴う二つの束縛性ポテンシャル井戸間での水分子の移動反応速度を始めて決定し、統計的モデルにより説明できることを明らかにした。さらに、これまで研究してきた反発型→束縛型井戸間の水分子移動[1]との反応機構の違いを議論している。

超音速ジェット中に生成する溶媒和クラスターに対する分光測定は、溶媒数、溶媒和構造などの詳細な情報を明確にした上でその溶媒和ダイナミクスを実験的に調べる直接的な手段を与える。このようなモデル系における分子間相互作用の微視的理解は柔軟な機能分子の運動メカニズムを溶媒の運動も含めて理解するための基礎を与えると期待される。

5HIはインドール環にOH基を導入した分子であり、二つの水素結合サイト間での水和の競合が起きる。NH基に水が配位したクラスターをイオン化するとOHより結合の強いOH基へと水の異動が生じる[2]。

図1左にこの再配向過程を実時間観測したナノ秒時間分解赤外スペクトルを示す。初め ($\Delta t = -50$ ns) S₀ で 3438 cm^{-1} に見られる振動は水素結合 NH 伸縮振動 ($v_{\text{NH}}^{\text{HB}}(\text{S}_0)$) であり、初期構造として水分子が NH 基に水和していることがわかる[2]。S₁ に励起されると ($\Delta t = -5$ ns)、 3388 cm^{-1} にわずかに低波数シフトする。イオン化されると ($\Delta t \geq 0$ ns)、まず 3200 cm^{-1} 付近にブロードな吸収が現われる。これはイオン状態の水素

結合 NH 伸縮振動 ($v_{\text{NH}}^{\text{HB}}(\text{D}_0)$) であり、水和構造を保ったままイオン化されたことがわかる。さらに時間が経過し $\Delta t = 10$ ns 程度になると、新たに 3464 cm^{-1} および $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 付近に吸収が現われる。これらは、OH 基に水和した構造の自由 NH 伸縮振動 ($v_{\text{NH}}^{\text{free}}(\text{D}_0)$) と水素結合 OH 伸縮振動 ($v_{\text{OH}}^{\text{HB}}(\text{D}_0)$) であり、水分子の異動がナノ秒スケールで起きることが確かめられた。

図1右には代表的なバンドの時間発展を示した。(a-d)に示した始状態 (NH 結合型) のバンドがイオン化とともに立ち上がるのとは対照的に、(e, f)に示した OH 結合型のバンドは明らかに遅く立ち上がり、その反応速度は ~ 10 ns と決定された。この速度は、イオン化直後に不安定な状態にイオン化される系における ~ 10 ps に比べ、約 1000 倍遅いことになる。本研究から、水分子の運動時間は分子間相互作用によって、極めて幅広い時間スケールにわたることが明らかとなった。

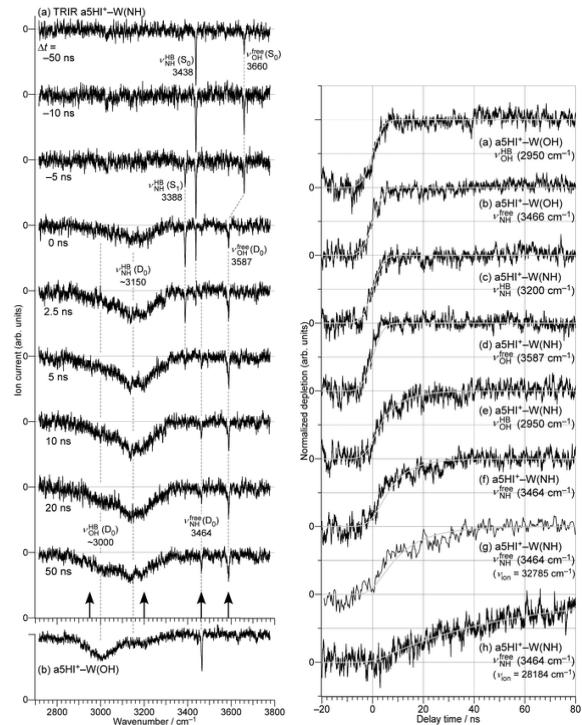


図 1. *ant*-5HI-W(NH)の時間分解赤外スペクトル (左) と代表的なバンドの時間発展 (右)。なお、*ant*-は OH 基の方向による配座異性体の一つを意味する。

引用文献

- [1] O. Dopfer and M. Fujii, *Chem. Rev.* **116**, 5432 (2016);
[2] T. Ikeda, et al., *J. Phys. Chem. A*, **120**, 1825 (2016).



業績紹介：芳香族アミドイオンのミクロスコピック水和構造の研究 —アセトアニリド-水クラスターの水和構造ネットワーク—

宮崎 充彦（東工大化生研・A02 計画研究分担者）
藤井 正明（東工大化生研・A02 計画研究代表者）

論文題目："Stepwise microhydration of aromatic amide cations: water solvation networks revealed by the infrared spectra of acetanilide⁺-(H₂O)_n clusters ($n \leq 3$)"

著者：Johanna Klyne, Matthias Schmies, Mitsuhiro Miyazaki, Masaaki Fujii, and Otto Dopfer

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**(5), 3148–3164 (2018).

本研究では、アセトアニリド - 水クラスターイオン ($\text{AA}^+ \cdot \text{W}_n$) の水和ネットワーク構造の発展を気相赤外分光と DFT 計算によって研究した。水和はイオン化により酸性度が増加する NH 基を中心として発展することがわかった。論文では、既に報告している類似分子ホルムアニリド (FA) との結果[1]を比較し、その水和構造の違いについて議論している。

気相孤立状態における溶媒和クラスターに対する分光測定は、溶媒数、溶媒和構造、溶媒配向などの詳細な情報を溶質分子に直接配位する分子だけに注目してその分子間相互作用を実験的に調べる直接的な手段を与える。凝縮系における測定では溶質と直接相互作用しない大量の溶媒分子の妨害のため、直接の（いわゆる第一溶媒和圏）溶質 - 溶媒相互作用を選択的に研究することは依然困難である。そのため、分子間相互作用の詳細な理解、および量子化学計算との比較を考える上で、依然重要な意味を持っている。

AA は最も単純なアミド分子の一つで、窒素原子にフェニル環を持つ。このため、ペプチド結合の水和に対する基本的なモデル系として研究されてきた。中性状態では、水分子はアミド基の C=O 基へはプロトンドナーとして、N-H 基へはプロトンアクセプターとして水和できる。しかし、AA をイオン化すると電荷との反発により N-H 基だけが水和サイトになる。従ってイオン状態では、N-H 基周辺に水和構造が発達する。

図 1 に得られた赤外スペクトルと DFT 計算によって得られた構造を示す。 $n = 1$ では、3200 cm⁻¹付近にブロードな水素結合 NH 伸縮振動が観測され、NH 基への水和が確認できる。 $n \geq 2$ では、3400 cm⁻¹付近にブロードな吸収が現われ、これは、NH 基に結合した水

分子の OH 結合が次の水分子と水素結合を作ったことによる水素結合性 OH 伸縮振動に帰属される。このことから、水和は AA⁺の他の結合サイトへ起こるのではなく、水分子同士の水素結合を優先して発達することがわかった。すなわち、AA⁺が中心となった球状の水和核が構成されるわけではなく、AA⁺は比較的疎水的であることを意味する。これは、AA⁺の電荷が水分子の分極を促し、水分子間同士の水素結合を強めるためである。

AA のメチル基を H に置換した FA イオンの水和と比べると、AA⁺では電荷の非局在化により N-H 基の酸性度が FA より低いため、相互作用が全体的に弱くなっている。また FA⁺のホルミル基の水素原子のような正電荷の集中する部位もないため、AA⁺と水分子の相互作用がより疎水的に働くため、水分子のネットワークが発達する傾向が FA⁺よりも強いことがわかった。これらの特徴は、溶媒同士の水素結合を生じない N₂ や Ar といった無極性分子による溶媒和とは異なっている[2]。この分子では、直接の電荷 - 誘起双極子相互作用が支配的であり、溶媒和は AA⁺を中心として球場に取り囲むように発達する。

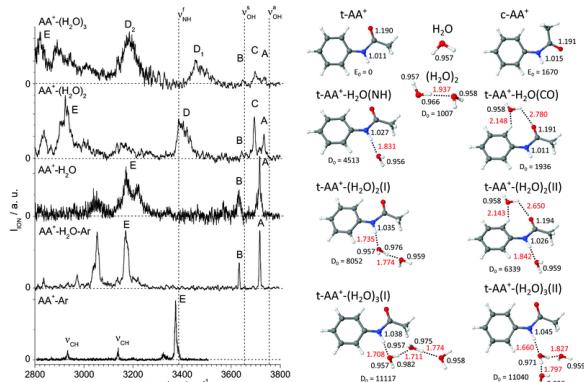


図 1. AA⁺-W_n ($n \leq 3$) の赤外スペクトルと DFT 計算によって得られた構造。

引用文献

- [1] J. Klyne, M. Schmies, M. Fujii, and O. Dopfer, *J. Phys. Chem. B* **119**, 1388 (2015); [2] M. Schmies, A. Patzer, M. Schütz, M. Miyazaki, M. Fujii, and O. Dopfer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 7980 (2014).

業績紹介 : PhOH の NH₃ 溶媒における酸解離に必要な溶媒数

宮崎 充彦（東工大化生研・A02 計画研究分担者）
藤井 正明（東工大化生研・A02 計画研究代表者）

論文題目："Theoretical study on the size-dependence of ground-state proton transfer in phenol–ammonia clusters"
著者：Toshihiko Shimizu, Kenro Hashimoto, Masahiko Hada, Mitsuhiro Miyazaki and Masaaki Fujii
雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20(5)**, 3265–3276 (2018).

本研究では、ホルムアニリド - 水クラスター (FA-W) のイオン化に伴う水分子の水和再配向メカニズムを気相孤立状態におけるピコ秒時間分解赤外分光と *ab initio* MD シミュレーションによって研究した。その結果とすでに研究を行っていたアセトアニリド - 水クラスター (AA-W) に対する結果[1, 2]と比較することで、アミド基の置換基のわずかな違い (FA: H, AA: CH₃) が振動エネルギー再分配 (IVR) 過程に大きな変化をもたらし、水和再配向ダイナミクスに強い影響を持つことを明らかにした。

超音速ジェット中に生成する溶媒和クラスターに対する分光測定は、溶媒数、溶媒構造、溶媒配向などの詳細な情報を明確にした上でその溶媒和ダイナミクスを実験的に調べる直接的な手段を与える。凝縮系における測定ではこれらの情報を明確に指定することは依然困難であるため、構造とダイナミクスの対応を詳細に理解するための理想的な系と考えられる。このようなモデル系における分子間相互作用の微視的理説は柔軟な機能分子の運動メカニズムを溶媒の運動も含めて理解するための基礎を与えると期待される。

FA は最も単純なアミド分子の一つで、窒素原子にフェニル環を持つ。中性状態ではアミド基の C=O、N-H のどちらにも水分子は水和できるが、イオン化すると N-H 結合だけが水和サイトになる。従って、C=O を水和した FA-W(CO) をイオン化すると、イオン状態で図 1 の挿入図に示したような C=O から N-H へと水分子の水和再配向が生じる[3]。

図 1 にこの再配向過程を実時間観測したピコ秒時間分解赤外スペクトルを示す。左が実験、右が *ab initio* MD シミュレーションによって得られた時間分解赤外スペクトルである。C=O 基に水和していた OH 伸縮振動 (R⁺) が、中間体 (T⁺) を経て NH を水和した生成

物 (P⁺: FA-W(NH)) に変化していく様子がわかる。

興味深い点は、ホルミル H を CH₃ に置換した AA-W(CO) における同様の C=O → NH 反応よりも反応速度が遅いことである。MD シミュレーションからは、AA-W の方が反応障壁、反応経路とも長いことが示されるため、FA-W の反応速度が遅いことは直感的な理解とは反している。MD から振動エネルギーの移動量を見積もると、反応の終息に必要な反応経路からのエネルギーの散逸 (いわゆる IVR) が FA-W ではかなり遅いことがわかった。AA-W では、自由度の大きい CH₃ 基の存在のため、IVR が加速されている。このことより、反応のポテンシャル局面の形状以上にエネルギーの散逸過程が反応の実際の速度に影響をおよぼすことが明らかとなった。

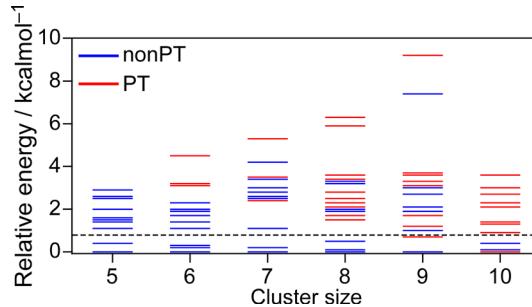


図 1. PhOH-(NH₃)_n (n=5–9) の異性体のエネルギー分布。青線が nonPT 型、赤線が PT 型構造を表わす。

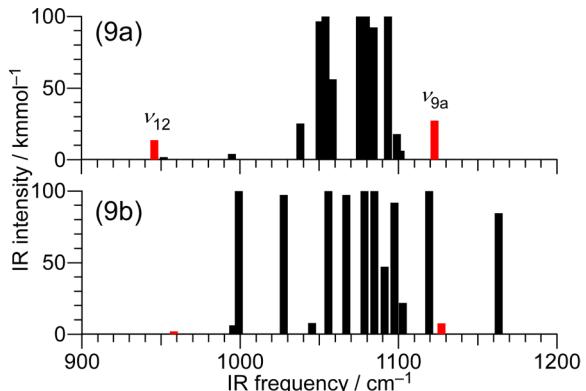


図 2. PhOH-(NH₃)₉ の最も安定な PT 型 (9a) と nonPT 型 (9b) 構造の赤外スペクトル。黒線は NH₃ の傘型振動 (ν₂)。

引用文献

- [1] M. Miyazaki, et al., *J. Phys. Chem. A* **117**, 1522–1530 (2013).



業績紹介：電子励起状態分子の回転波動関数イメージング

水瀬 賢太 (東工大・A02 公募研究代表者)
池田 大 (東工大・A02 公募研究協力者)
大島 康裕 (東工大・分子研・
A02 公募研究連携研究者)

論文題目："Visualizing rotational wave functions of electronically excited nitric oxide molecules by using an ion imaging technique"

著者：Kenta Mizuse, Nao Chizuwa, Dai Ikeda, Takashi Imajo, and Yasuhiro Ohshima

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3303-3309 (2018)

分子ダイナミクスの明瞭な可視化は、分子運動の深い理解と高度な利活用につながる。我々のグループでは分子間振動や分子回転のような低振動ダイナミクスを「柔らかさ」の起源としてとらえ、その運動を可視化する実験手法の開発を進めてきた。本領域研究の間に、独自のイオンイメージング法を開発し、いくつかの低振動モードの可視化に成功している¹。詳細な研究背景は後述するが、最近、開発した手法が、電子励起状態分子の選択的観測においても有効であるという着想を得て、手法の展開を進めている。本論文は、イオンイメージングによる励起状態研究の第一弾として、電子励起状態分子の回転波動関数可視化を実現した成果についてまとめたものである。

分子運動は一般に波動関数で記述されるため、波動関数のキャラクタライズがダイナミクス研究において本質的に重要となる。近年、超短パルスを用いたクーロン爆発イメージングや高次高調波によるトモグラフィーなどによって波動関数（の2乗）や波束の関数形を直接的に可視化する研究が展開されてきた。こうした研究のほとんどが電子基底状態分子を対象してきたが、対象を励起状態分子に拡張することができれば、基礎的な光化学反応や素過程、光駆動性分子の機能評価といった展開が期待できる。

一般に励起状態の構造情報や配向情報を抽出する際の困難として、励起状態の分布数が少ないことが挙げられる。典型的な光励起ではせいぜい数%の分子しか励起されないため、例えばX線や電子線実験のような手法では大多数の基底状態分子由来の信号が主に観測されてしまう。そのため、励起状態由来の信号の選択的な検出方法が求められてきた。我々がこれまで開発

してきたイオンイメージング法では、いわばイオン化されやすい分子が選択的に検出される。ここで、電子励起状態分子は（当然のことながら）基底状態分子よりもイオン化されやすいため、イオン画像上で大きな信号強度を与えることが期待される。本研究では、図1のスキームに基づく、励起状態選択的なイメージングが可能か検証を行った。

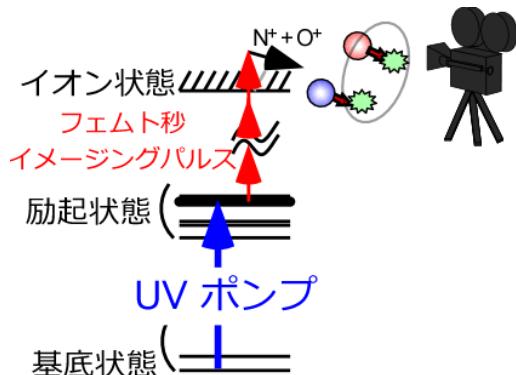


図1 励起状態選択的イオンイメージングの励起スキーム。

具体的な観測対象として、一酸化窒素(NO)分子の電子励起状態における分子軸分布(回転波動関数の2乗)を取り上げた。まず紫外ナノ秒パルスにより、励起状態における回転固有状態へ励起した。続いてフェムト秒強レーザーパルスを照射し、解離性イオン化によって放出された原子イオンの空間分布を画像観測した。図2に得られた画像と角度分布(回転波動関数の2乗)を示す。実験で得られた画像は教科書的に期待される関数形(図2c)をよく反映しており、本手法が励起状態ダイナミクス研究に対する新しいアプローチになりえることを示唆するものとなった。

(a) observed (b) angular (c) calculated
N⁺ image distribution distribution

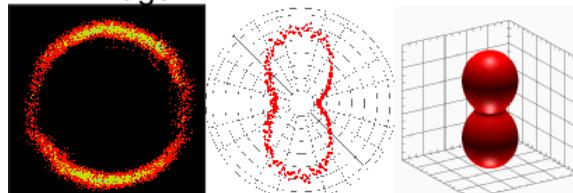


図2 (a) 観測したイオン画像。 (b) 画像から得られた分子軸の角度分布（回転波動関数の2乗）を極座標表示したものの。 (c) ${}^2\Sigma^+, J = 3/2, |M| = 1/2$ に対する角度分布の計算値。

引用文献

- [1] K. Mizuse, K. Kitano, H. Hasegawa, Y. Ohshima, *Sci. Adv.* **1**, e1400185 (2015).



業績紹介：パーカルオロ基とアルキル基を持つ 2 成分系ゲル化剤における VCD 法による動的過程の立体化学効果の解明

佐藤 久子 (愛媛大・A02 公募研究代表者)

論文題目：" Stereochemical effects on dynamics in two-components systems of gelators with perfluoroalkyl and alkyl chains as revealed by vibrational circular dichroism "

著者 : Hisako Sato, Tomoko Yajima, and Akihiko Yamagishi

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20, 3210-3215 (2018).

本プロジェクトでは、次元拡張型 VCD 装置の開発を行い、それを用いたペプチドオリゴマー中の D-アミノ酸の検出を目指した研究を行っている。

キラル分光法の一つである振動円二色性 (VCD) 法は赤外領域の円二色性を検出する手段である。特徴としては、ほとんどすべての物質に適用でき、各基準振動について多量の情報が得られることがある。一方、この方法の弱点としては、VCD シグナルの強度が非常に小さいことがある。

我々はキラルな低分子量ゲル化剤によるゲル化機構の研究を行ってきた。この過程で、ゲル化に伴い VCD シグナルが顕著に（数十倍の程度）増大することを見出した。3 次元的規則構造を持たないゲルにおいて、正負の符号を有する円二色性のような性質は、分子本来のキラリティに起因する部分以外は、ランダム構造の中で平均化され減衰してしまうのが自然と考えられる。それにも拘わらずシグナルが増大するのは、ゲル化剤分子がある一定のキラル構造のもとに連結されていることを反映した結果であると考えた。そこでこれを利用すれば、非晶質ゲルの構造を分子レベルで明らかにする道が拓けると着想した。さらに、パーカルオロ鎖はフッ素原子間の立体障害により自発的にらせんを巻くことが知られている。ゲルの不齊構造の発現にはらせんを巻いたパーカルオロ基が重要な役割をしていると予想した。

本論文では、パーカルオロ基をもつジアミノシクロヘキサン系低分子量ゲル化剤 (CF7) とアルキル基 (CH7) をもつ 2 成分系のキラルゲルに対して VCD 法を適用した。2 種のゲル化剤を用いることによるゲル化速度と熱力学的安定性への影響を検討した。特に、ゲル化

剤のキラリティの影響(立体化学的效果)に着目した。VCD 法の特徴として、2 種のゲル化剤分子の C=O 伸縮を別々に観測・追跡できるという点がある。

2 種のゲル化剤が *RR/RR* (または *SS/SS*) の場合 (疑似キラル対) と、*RR/SS* (または *SS/RR*) の場合 (疑似ラセミ対) を比較した。その結果、擬似キラル対においては、アセトニトリル中で、CF7 のゲル化速度が遅く、この C=O 伸縮の VCD 強度が時間に伴い増大する、一方、CH7 のシグナルは時間変化なく同じ大きさを保つことを観測した。走査電子顕微鏡像の時間変化から、先に CH7 がゲル化をし、その後に CF7 がゲルになる様子を観測することができた。これに対して、擬似ラセミ対の場合には、速やかに均一なゲル化が進むことを観測した。このことは、それぞれのゲル化剤が単独に存在する場合は、両者ともゲル化能は示さず結晶化が起こってしまうことと対比される。

VCD 吸収がゲル化に伴い増大していく現象の理論的解明は現在、A01 班の鳥居肇教授と検討中である。この領域での共同研究によって、パーカルオロ基をもつゲル化にともなう VCD シグナル増大機構を明らかにしたいと思っている。

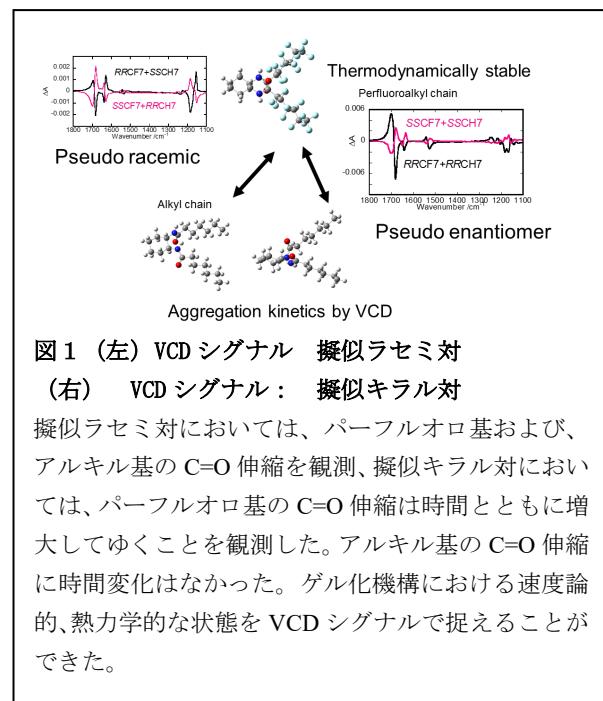


図 1 (左) VCD シグナル 擬似ラセミ対

(右) VCD シグナル： 擬似キラル対

擬似ラセミ対においては、パーカルオロ基および、アルキル基の C=O 伸縮を観測、擬似キラル対においては、パーカルオロ基の C=O 伸縮は時間とともに増大してゆくことを観測した。アルキル基の C=O 伸縮に時間変化はなかった。ゲル化機構における速度論的、熱力学的な状態を VCD シグナルで捉えることができた。



業績紹介：分子認識に対する固体 VCD 法：粘土鉱物にインタークレートしたキラル金属錯体

佐藤 久子 (愛媛大・A02 公募研究代表者)

論文題目：" Solid-state vibrational circular dichroism towards molecular recognition: chiral metal complexes intercalated in a clay mineral"

著者 : Hisako Sato, Kenji Tamura, Kazuyoshi Takimoto, and Akihiko Yamagishi

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 3141-3147 (2018). (2017 Hot Article)

本プロジェクトでは、次元拡張型 VCD 装置の開発を行い、それを用いたペプチドオリゴマー中の D-アミノ酸の検出を目指した研究を行っている。

本論文は、固体表面における不斉識別機構に固体 VCD 法を適用した研究例を報告した。層状無機化合物の粘土鉱物では、層表面はシリケートとアルミニネートが 2 次元網目状に連結した規則構造を持っている。我々は、粘土表面にキラル金属錯体をイオン交換で吸着させ、均一な溶媒中では見られない特異な分子間相互作用を実現させることを試みて来た。粘土鉱物は絶縁性の微結晶であることから、STM などのプローブ顕微鏡や 3 次元 X 線構造解析などの方法の適用が難しい。その結果、粘土面での分子識別機構のミクロレベルの解明には大きな困難が伴う。そこでこれを乗り越えるための新しい手段として、振動円二色性分光 (VCD) 法の適用を検討した。VCD 法を層状化合物に初めて適用した例である。

キラル分光法の一つである振動円二色性 (VCD) 法は赤外領域の円二色性を検出する手段である。特徴としては、ほとんどすべての物質に適用でき、各基準振動について多量の情報が得られることがある。しかし、VCD シグナルの強度が非常に小さいという弱点がある。本プロジェクトにおいて、VCD 装置のバージョンアップを行い、ベースラインの長期間安定性を実現し、信号/雜音比をあげて微弱シグナルの測定を可能とした。それと同時に直線偏光の測定も可能とし、固体 VCD 法の確立を目指している。

粘土鉱物(モンモリロナイト)表面にキラルな金属錯体 Δ -あるいは Λ - $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($\text{phen}=1,1\text{-phenanthroline}$) を吸着させて、モンモリロナイト表面にキラル認識場を作製した。インタークレ

ートした錯体の Δ 体、 Λ 体に対応して反転したシグナルを得ることができた。さらに、この試料中にキラル物質として有機分子である R -あるいは S -BINOL (1,1'-bi-2-naphthol) を吸着させ、モンモリロナイト面上におけるキラル分子間の相互作用を検討した。モンモリロナイトを含めた 3 成分系に VCD 法を適用した結果、金属錯体と有機分子間に働く立体選択性的な相互作用に関してミクロレベルでの証拠を得ることができた。具体的には、柔らかな分子である BINOL が堅い $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ のキラリティの影響を受けて、コンフォーメーション変化 (OH の向き) を起すことを VCD のシグナル変化として観測することができた。さらに興味あることとして、BINOL の VCD シグナルの強度が、相互作用する相手である $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ のキラリティによって顕著に変わることも見出した。この現象は、強い相互作用をする系において、非局在化した電子状態による振動のカップリングが起きているためと推測している。今後、このようなことが他の系でも起こるのかどうか検証してゆきたいと思っている。この点で、理論の先生方との共同研究を切望している。

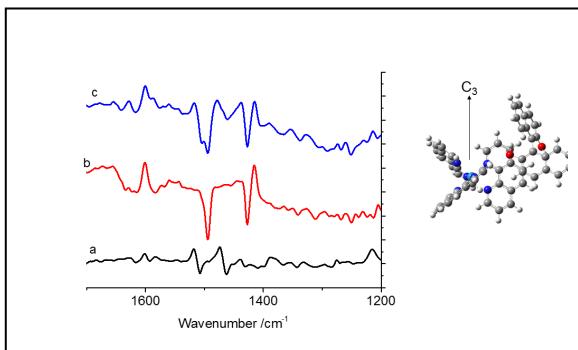


図 1 (左) VCD シグナル (a) R -BINOL (CD₃CN 中)
(b) モンモリロナイトにインタークレートした Δ - $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (c) モンモリロナイト中の R -BINOL および Δ - $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (右) 計算結果による $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ と R -BINOL 会合状態



業績紹介：ベンゼン二量体型ラジカルカチオンの非局在電子を伴う大振幅振動の選択的観測

岡島 元 (青山学院大 理工・A02 公募研究連携研究者)
坂本 章 (青山学院大 理工・A02 公募研究代表者)

論文題目："Selective resonance Raman enhancement of large amplitude inter-ring vibrations of [3₄](1,2,4,5)cyclophane radical cation; a model of π-stacked dimer radical ions"

著者 : Hajime Okajima, Teruo Shinmyozu and Akira Sakamoto

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 3395-3402 (2018).

共役 π 電子系イオン種の非局在化した電子は、分子内および分子間の電荷移動や、電荷移動に伴う機能発現の鍵となる。[3₄](1,2,4,5)シクロファン[1]は、2 つのベンゼン環を 4 本の炭素鎖で架橋した分子であり、ベンゼン二量体のモデルとなる。この二量体型分子のラジカルカチオンは、1 つの電子を 2 つのベンゼン環の間で共有するため、2 つの環に非局在化した電子をもつ。我々はこれまでに、このラジカルカチオンを対象に赤外吸収測定を行い、2 つのベンゼン環の間で非局在電子のやり取りを誘起する振動モードが、大きな赤外吸収強度をもつことを明らかにした[2]。本研究では、このラジカルカチオンの非局在電子に共鳴させたラマン分光測定を行い、低振動数領域の非局在電子に密接に関係する分子内大振幅振動の選択的観測と解析を行った。

[3₄](1,2,4,5)シクロファンは塩化鉄(III)で化学酸化され、安定なラジカルカチオンを生じる。このラジカルカチオンは、2 つのベンゼン環に非局在化した電子により、近赤外領域(740 nm)に電子吸収をもつ[2]。そこで、この電子遷移に近い 785 nm の励起光を用いて近赤外共鳴ラマン分光測定を行った。得られたラマンスペクトルでは、低振動数領域のみに明瞭なバンドが観測された(図の赤線)。ラジカルカチオンにおいて最も大きな強度をもつ 242 cm⁻¹ のラマンバンドは 2 つのベンゼン環の間隔を変える面間大振幅振動(ν_8)に帰属でき、そのラマン散乱断面積は $9.1 \times 10^{-25} \text{ cm}^2$ と見積もることができた。これは同じイオン種のベンゼン環呼吸振動(1262 cm^{-1} , ν_{87})に比べ 100 倍以上大きく、典型

的な共鳴ラマン断面積と同等であった。

このような選択的な共鳴増強効果を理解するために、ラジカルカチオンの偏光ラマン測定および量子化学計算を行った。全てのラマンバンドの偏光消比はおよそ 1/3 であった。これは 1 つの非縮退な電子励起状態だけが寄与する共鳴ラマン効果の A 項で説明できる。また、時間依存密度汎関数法(TD-DFT 法)による計算から、ラジカルカチオンの近赤外領域の吸収は、2 つのベンゼン環の π 軌道に関して“結合性”の分子軌道から“反結合性”的轨道への電子遷移に由来すること、また、この電子遷移に寄与する電子励起(S₂)状態では、基底状態に比べて面間隔が 7% 程度広がることが明らかになった。このような面間隔の増加は、面間隔を変える大振幅振動に対して大きなフランク・コンドン因子をもたらす。したがって、非局在電子との共鳴ラマン効果によって、 ν_8 のような面間大振幅振動が選択的に増強されたと考えられる。

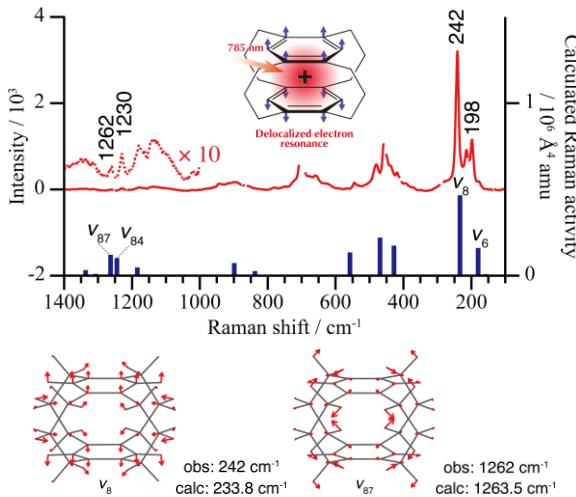


図 [3₄](1,2,4,5) シクロファンラジカルカチオン(ジクロロメタン中, FeCl₃で化学酸化)のラマンスペクトル(赤線)と計算前期共鳴スペクトル(紺バー, a_g モードのみ表示)。下図はラジカルカチオンの面間大振幅振動(ν_8)とベンゼン環呼吸振動(ν_{87})の振動形。計算レベルは B3LYP/6-311+G** レベル、振動数スケール因子は 0.998。

引用文献

- [1] M. Fujitsuka, T. Shinmyozu, T. Majima *et al.*, *J. Phys. Chem. A*, **110**, 5735-5739 (2006).
[2] A. Sakamoto, N. Tanaka, T. Shinmyozu, *Chem. Phys.*, **419**, 266-273 (2013).



業績紹介：カロテノイドの振動緩和ダイナミクスは共役主鎖末端の置換基の影響を受ける？

高屋 智久 (学習院大・A02 公募研究代表者)

論文題目："Vibrational relaxation dynamics of β -carotene and its derivatives with substituents on terminal rings in electronically excited states as studied by femtosecond time-resolved stimulated Raman spectroscopy in the near-IR region"

著者 : Tomohisa Takaya, Masato Anan and Koichi Iwata

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3320-3327 (2018).

カロテノイドは生体中に存在する主要な発色団の一群であり、その種類は 750 以上といわれる[1]。これらのカロテノイドは互いに異なる共役主鎖構造、末端基構造、および対称性を有し、このような構造の違いに起因して、生体中において互いに異なる機能や特性を示すと考えられる。

われわれは、生体中のカロテノイドが光吸収によって得たエネルギーがどのように散逸するかを明らかにするため、近赤外光を用いた超高速誘導ラマン分光計による計測を進めている。これまでに β -カロテンの第二励起一重項(S_2)状態および最低励起一重項(S_1)状態の励起ダイナミクス計測を行い、 S_2 状態から S_1 状態への内部転換における余剰エネルギー散逸の機構を明らかにした[2]。本研究ではカロテノイド末端基構造が振動エネルギー散逸過程に及ぼす影響を評価することを

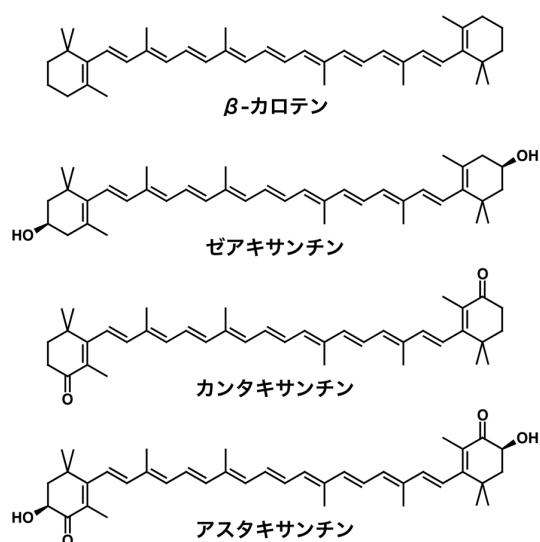


図 1 共役主鎖末端に異なる置換基を有する 4 種類のカロテノイドの構造式。

目的とし、 β -カロテンの末端環に置換基を導入したカロテノイド（図 1）について、フェムト秒時間分解近赤外吸収および誘導ラマンスペクトルを計測した。

時間分解近赤外吸収計測から $S_2 \rightarrow S_1$ の内部転換速度定数を見積もると、末端環にカルボニル基を持つ誘導体のほうがカルボニル基を持たない誘導体よりも大きな速度定数を示した。この増大は、カロテノイドの持つ実効的な共役長がカルボニル基によって伸長したことによると考えられる[3]。一方、時間分解誘導ラマン計測から S_1 状態における振動エネルギー再分配速度定数を見積もると、こちらも末端環にカルボニル基を有する誘導体のほうが大きくなかった（図 2）。実効的な共役長の違いのみでは、この結果を単純に説明することができない。われわれは、カルボニル基の導入によってカロテノイドの主鎖平面と末端環平面のなす二面角が小さくなり、主鎖の振動のエネルギーが末端環へと分配されやすくなっている可能性を考えている。

以上の研究により、カロテノイドの励起ダイナミクス、とくに振動エネルギー緩和ダイナミクスがカルボニル基によって大きく影響されることが明らかとなつた。カロテノイドは多くの場合タンパク質に結合して存在しているが、タンパク質との結合がカロテノイドの振動エネルギー緩和ダイナミクスに大きな影響を与える可能性が示唆された。

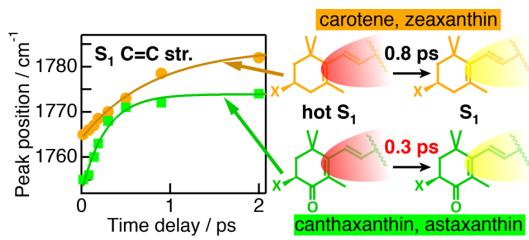


図 2 フェムト秒時間分解誘導ラマン分光計で計測した、カロテノイド S_1 状態の $C=C$ 伸縮振動バンドのピーク位置の時間変化。

引用文献

- [1] 作道隆, 土田耕三, 蛋白質 核酸 酶素 **53**, 125-131 (2008).
- [2] T. Takaya and K. Iwata, *J. Phys. Chem. A* **118**, 4071-4078 (2014).
- [3] D. Kosumi, M. Fujiwara, R. Fujii, R. J. Cogdell, H. Hashimoto, and M. Yoshizawa, *J. Chem. Phys.* **130**, 214506 (2009).

業績紹介：酸化チタンにおける発光再結合と非発光再結合過程の分子吸着依存性

山方 啓（豊田工大・A02 公募研究代表者）

論文題目："Oxygen Induced Enhancement of NIR Emission in Brookite TiO_2 Powders: Comparison with Rutile and Anatase TiO_2 Powders"

著者：Junie Jhon M. Vequizo, Sunao Kamimura, Teruhisa Ohno, and Akira Yamakata

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 3241-3248 (2018).

ブルッカイト型酸化チタンは、新しい合成法が開発され近年活発に研究されている材料である[1]。そこで、本研究ではこれらの材料のバンドギャップを励起して生成する光励起キャリアーの発光再結合過程と非発光再結合過程の違いを時間分解発光分光測定と時間分解吸収分光測定を行うことで比較した。

まず、真空中でブルッカイトに紫外光を照射して発光を測定すると、図 1 C, D を見て分かるように、520 nm と 860 nm に発光があることが分かった。次に分光セルにメタノール蒸気を導入し同様な実験を行うと、520 nm と 860 nm の強度は共に小さくなつた。これは図 2 に示すようにメタノールによって正孔が消費されたためである。一方、酸素ガスを導入するとメタノールとは全く異なる結果となつた。可視域の発光は弱くなるが、近赤外域の発光は強くなつた。このメカニズムは、図 2 で説明できる。酸素ガスを導入すると、酸化チタンの上向きのバンドベンディングが増強され、電荷分離が促進される。さらに酸素分子によって浅いトラップ電子が消費されるので、可視域の発光は抑制される。しかし、近赤外発光の場合、深くトラップされた電子は主に表面欠陥に局在化しており[1]、バンドベンディングの増強によって表面に正孔が蓄積される。その結果、酸素分子の吸着によって深くトラップされた電子と正孔の表面濃度が増加するので近赤外発光は増強される。

時間分解発光分光測定の結果、860 nm の近赤外発光の寿命 (43 ns & 589 ns) は 520 nm の可視発光の寿命 (15 ns & 23 ns) よりも長かった。これは深くトラップされた電子は浅くトラップされた電子よりも動きが遅いので正孔との再結合速度が遅いためと説明できる。しかし、その遅い近赤外発光の寿命でさえ、時間分解吸収分光測定で観察したトラップ電子の寿命 (1.5 μs)

& 17 μs) より 1~2 衍短かつた。この結果は酸化チタンの場合、発光再結合よりも非発光再結合が大部分であることを意味している。つまり、光触媒活性を支配する光励起キャリアーの挙動を理解するためには発光分光測定だけではなく、吸収分光測定も行う必要があることを意味している。

[1] Junie Jhon M. Vequizo, Hironori Matsunaga, Tatsuya Ishiku, Sunao Kamimura, Teruhisa Ohno, and Akira Yamakata, *ACS Catalysis* 7, 2644-2651 (2017).

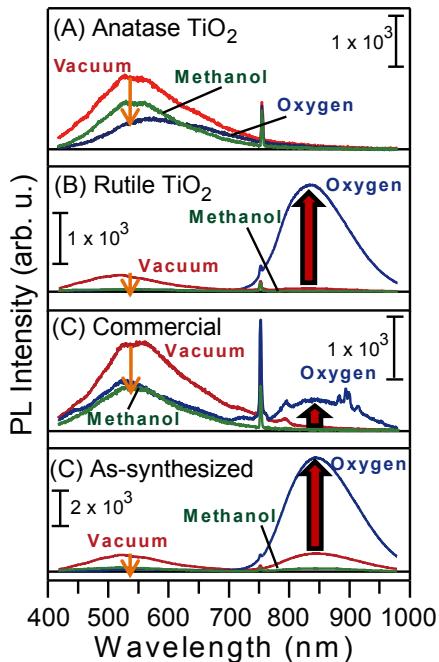


図 1 アナターゼ型、ルチル型、市販のブルッカイト型、自作したブルッカイト型酸化チタンのバンドギャップを励起して観察される可視・近赤外発光の導入ガス依存性。

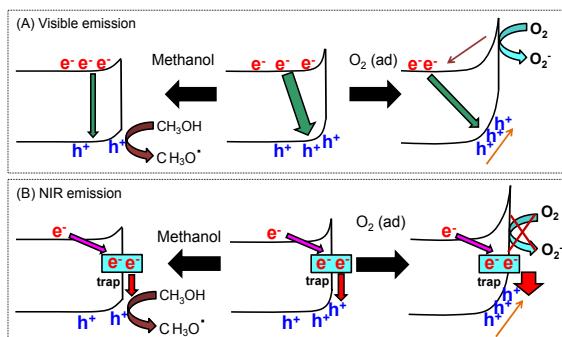


図 2 酸素分子やメタノール分子吸着によるバンドベンディングの変化と可視・近赤外発光の強度の変化。



業績紹介：酸化チタン光電極界面における水素結合ネットワークの時間分解分光観察

山方 啓（豊田工大・A02 公募研究代表者）

論文題目："Structural Changes of Water Molecules during Photoelectrochemical Water Oxidation on TiO_2 Thin Film Electrodes"

著者：Chandana Sampath Kumara Ranasinghe and Akira Yamakata

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 3388-3394 (2018).

半導体光電極を用いた水の分解反応は、クリーンで環境に負荷をかけない新しい水素製造方法として期待されている。しかし、この光電極触媒の活性を向上させるためには反応機構を理解することが必要である。そこで本研究では図 1 に示すように、サファイア ATR プリズムの反射面に酸化チタン薄膜電極を作製し、この酸化チタン電極に紫外光レーザーパルスを照射して進行する水分子の酸化分解過程を時間分解赤外分光装置を利用して観察した。

酸化チタン電極に紫外光レーザーパルスを照射して可視から近赤外域の過渡吸収スペクトルを測定するとトラップ電子と正孔の減衰過程を調べることができる [1]。酸化チタン電極に正電位を印加すると、光酸化反応がより進行するが、この時に反応を誘起する光励起キャリアーの再結合寿命が実際に長くなる様子が観測された。この結果は電位の印加によって n 型半導体と水の界面に形成された上向きのバンドベンディングが大きくなり、電荷分離が促進されたためとして説明できる。一方、図 2 に示すように、中赤外域の時間分解スペクトルには、伝導帯に励起された自由電子による吸収の他に、水分子の構造変化による吸収変化が観察された。水の酸化反応が進行する電位 (-0.5 V 以上) で酸化チタンのバンドギャップを励起すると、水素結合した水に帰属される吸収 (3350 cm^{-1} と 3120 cm^{-1}) が減少した。この減少量は水の分解反応がより進行しやすい正電位にすればするほど増加することから、水分子の酸化反応によるものと考えることができる。一方、水の酸化が定常的に進行する電位よりもわずかに低い電位 (-0.6 V) では、 3620 cm^{-1} に水素結合していない水に帰属される吸収が観測された。この水素結合していない水分子の出現は、酸化チタンのバンドギャップを励起すると、電極界面における水素結合ネット

ワークが切断されることを意味している。従来、酸化チタンに光を照射すると超親水性が発現されるので界面の水素結合ネットワークは強くなると考えられてきた。しかし、水の酸化反応が進行する際には、水分子に正孔が移動して生成する OH ラジカルや H_2O_2 などの反応中間体との相互作用により、界面の水素結合ネットワークは弱くなることが分かった。

[1] A. Yamakata, J. J. M. Vequizo and H. Matsunaga, *J. Phys. Chem. C*, **119**, 24538 (2015).

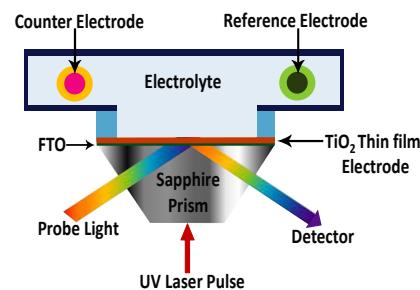


図 1 サファイアプリズム表面に調製した酸化チタン薄膜電極と光誘起表面反応の可視中赤外時間分解分光観察。

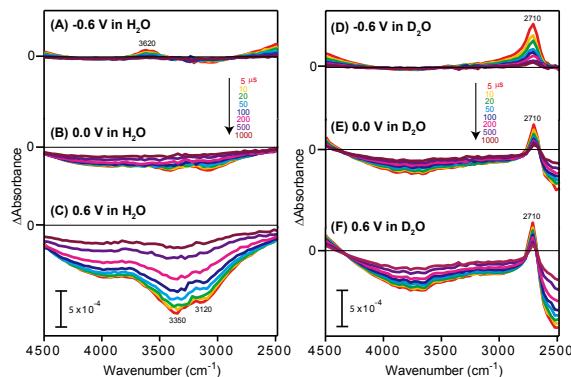


図 2 酸化チタン薄膜電極を紫外光で励起した際に起こる界面の水分子の構造変化の印加電圧依存性。

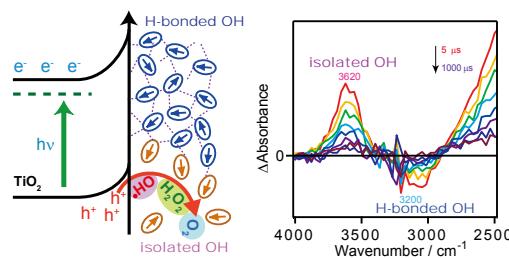


図 3 酸化反応中間体の生成による水素結合の切断。



業績紹介：結晶性多糖を連続的に分解するリニア分子モーター—キチナーゼの 1 分子蛍光イメージング解析

飯野 亮太 (分子研・A02 公募研究代表者)
内橋 貴之 (名古屋大・A03 公募研究代表者)

論文題目："Rate Constants, Processivity, and Productive Binding Ratio of Chitinase A Revealed by Single-molecule Analysis"

著者 : Akihiko Nakamura, Tomoyuki Tasaki, Yasuko Okuni, Chihong Song, Kazuyoshi Murata, Toshiya Kozai, Mayu Hara, Hayuki Sugimoto, Kazushi Suzuki, Takeshi Watanabe, Takayuki Uchihashi, Hiroyuki Noji, and Ryota Iino

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3010-3018 (2018)

結晶性多糖のキチンは、カニやエビ、昆虫などの殻を構成する生体高分子で、植物が作るセルロースに次いで地球上に豊富に存在するバイオマスです。キチンの構成分子である N アセチルグルコサミンは窒素源として、化学、製薬分野で利用することができますが、キチンは安定な結晶構造を持つため、分解には高温、強酸・強アルカリ等の激しい処理が必要となります。

他方、自然界では細菌やカビの一種がキチナーゼと呼ばれる酵素を分泌し、穏やかな条件下でキチンを分解することが知られています。さらに最近の高速 AFM 観察では、ある種のキチナーゼはキチンを分解しつつ動く分子モーターであることが明らかになっています [1]。

本論文では 1 分子蛍光イメージングを用い、キチナーゼが結晶性キチンを分解する反応素過程（結晶表面への結合、一方向性運動、解離）の速度定数、プロセシビティ（反応の連続性）、および分解を伴う結合の割合を全て定量的に求めるに成功しました（図）。特に、運動速度（ 52.5 nm/s ）から予測される加水分解速度（ 52.5 s^{-1} ）と生化学測定で求めた加水分解速度（ 2.6 s^{-1} ）の大きな乖離は、運動（分解）を伴う結合の割合が非常に低い（4.8%）ためであることを初めて明らかにしました（図 1）。

尚、本研究では、チューブワームの一種であるサツマハオリムシから調製した結晶性キチンを基質に用いました。結晶性キチンは結晶面によって表面に露出したキチン分子の向きが異なり、キチナーゼの反応性が異なります。言い換えると、各結晶面のキチン分子の

向きがわからないと、計測データの定量的解釈が困難になります。そこで、高速 AFM 観察とクライオ電子顕微鏡トモグラフィーを駆使して結晶性キチンの外形を正確に計測し、各結晶面のキチン分子の向きをモデリングすることにも成功しました（図 2）。

本研究では、固／液界面で起こる生体不均一反応の解析に 1 分子計測が非常に有効であることを示すことができ、PCCP 誌の Inside Back Cover に選んで頂きました。現在は本研究を発展させ、金ナノプローブを用いた高速高精度 1 分子イメージングで、キチナーゼの運動素過程と律速段階の解明に取り組んでいます。

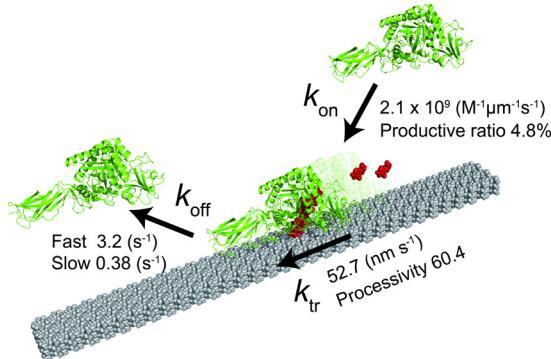


図 1 本研究で求めたキチナーゼの反応速度定数と運動を伴う結合の割合。

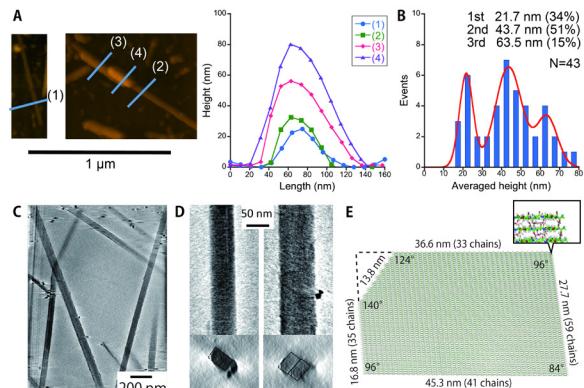


図 2 結晶性キチンの (A) 高速 AFM 像、(B) 高速 AFM 像から求めた高さの分布、(C, D) クライオ電顕十グラフィー像、(E) 構造モデル。

引用文献

- [1] K. Igarashi et al., *Nat Commun* **5**, 3975 (2014).



業績紹介：新規光駆動内向きプロトンポンプの分光学的解析と輸送モデルの提唱

井上 紗希（岡山大・研究協力者：大学院生）

小島 慧一（岡山大・研究協力者：助教）

須藤 雄気（岡山大・A02 計画研究分担者）

論文題目：“Spectroscopic characteristics of *Rubricoccus marinus* xenorhodopsin (*RmXeR*) and a putative model for its inward H⁺ transport mechanism”

著者：Saki Inoue, Susumu Yoshizawa, Yu Nakajima, Keiichi Kojima, Takashi Tsukamoto, Takashi Kikukawa, & *Yuki Sudo

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 3172-3183 (2018).

生物は生命活動を維持するために、細胞膜中にイオントransporterを有している。その代表例が細胞内から細胞外に H⁺を輸送する“外向き H⁺ポンプ”である。外向き H⁺ポンプによって形成される細胞膜を介したプロトン濃度勾配は、プロトン駆動力とも呼ばれ、ATP の合成や運動制御など、様々な生命活動に関わっている。微生物型ロドプシンは、発色団レチナールを持つ光受容膜タンパク質である。近年のゲノム科学の進展により、生物の三大ドメイン（古細菌、真正細菌、真核生物）の幅広い生物種から万を超える新規ロドプシン遺伝子が発見され、その機能は光駆動イオントransporterや光センサーなど多岐に渡ることが明らかとなってきた。このうち、外向き H⁺ポンプ型ロドプシンは、高度好塩古細菌や海洋性細菌などの微生物のプロトン駆動力の产生に寄与し、その生物学的意義や光遺伝学ツールとしての重要性から分子機能の解析が進んでいる。一方、逆向きに H⁺を輸送する内向き H⁺ポンプはプロトン駆動力の产生を阻害することから、自然界には存在しないと考えられてきた。

そのような背景のもと、2011年に共同研究者の吉澤らは、海洋性細菌 *Rubricoccus marinus* SG-29^T株のゲノム上に新規ロドプシン遺伝子が存在することを見出した[1]。アミノ酸配列の分子系統学的解析の結果、このロドプシンはゼノロドプシン (XeR) と呼ばれるクレードに分類された。XeRに分類されるロドプシンの多くは機能未知であったが、当研究室では XeR に分類される藍藻・アナバナ由来 *Anabaena* sensory rhodopsin がアルギニン残基を多く含む C 末端領域を介して、光依存的な転写調節因子として機能することを明らかにしてきた[2]。しかし *Rubricoccus marinus* の XeR (*RmXeR*) にはこの領域が欠損しており、転写調節とは

異なる機能を持つことが示唆された。

そこで、*RmXeR* の機能を調べるために、*RmXeR* を大腸菌に組み換え体として発現させ、その菌懸濁液の光依存的な pH 変化を測定した。その結果、光照射によって pH が上昇し、この変化はプロトノフォアの添加で強く抑制された。このことから、*RmXeR* は細胞外から細胞内への“内向き H⁺輸送体”であると結論した。2016年に、名工大の神取グループより見出された別のゼノロドプシン (*PoXeR*) [3]は、内向き H⁺ポンプとして機能し、*RmXeR* と高い相同意性（約 70 %）を示すことから、*RmXeR* も“内向き H⁺ポンプ”として機能すると考えられる。次に、精製した *RmXeR* を用いて分光学的性質を調べた結果、以下の特徴を見出した：

- (1)明順応によりレチナールの all-trans 体の割合が減少し 13-cis 体が増加する（図左）、(2)酸性条件で吸収スペクトルが短波長シフトする（図右）。これらは外向き H⁺ポンプとは真逆の性質であった。さらに、*RmXeR* の光反応を調べるために、時間分解過渡吸収変化を解析したところ、*RmXeR* は all-trans 体のレチナールの光異性化をきっかけに、3 つの中間体 (L, M, O) を経て元に戻る環状の反応を示し、M 中間体の形成と崩壊に伴って H⁺の取り込みと放出が起こる輸送モデルを提唱した（図中央）。

RmXeR や *PoXeR* の発見により、外向きのみならず内向きに H⁺を能動輸送するポンプが自然界に存在していることが示された。このことは、“ロドプシンの分子機能の柔らかさ”を象徴しているといえる。今後は、*RmXeR* の特異な機能や特徴を産み出す分子基盤の解説だけでなく、*RmXeR* の生理学的機能の解明や光遺伝学への応用を目指していきたい。

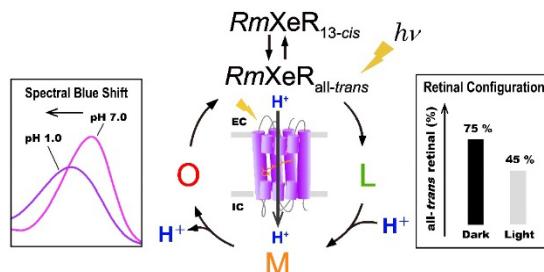


図 *RmXeR* の光反応サイクルと特徴的な性質

引用文献

- [1] Park S, et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**, 2069 (2011).
- [2] Irieda H, et al., *J. Biol. Chem.*, **287**, 32485 (2012).
- [3] Inoue K, et al., *Nat. Commun.*, **7**, 13415 (2016).



業績紹介：進化的に保存された真正細菌型イオンポンプの内部結合水

井上 圭一（名工大・A03 計画研究連携研究者）
神取 秀樹（名工大・A03 計画研究代表者）

論文題目："Low-temperature FTIR spectroscopy evidences protein-bound water molecules in eubacterial light-driven ion pumps"

著者 : Yurika Nomura, Shota Ito, Miwako Teranishi, Hikaru Ono, Keiichi Inoue, Hideki Kandori

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3165-3171 (2018).

微生物型ロドプシンは細菌などが持つ 7 回膜貫通型構造の光受容膜タンパク質である。微生物型ロドプシンを持つ細菌は海洋を中心に広く自然界に分布し、これまでに 1 万種近くが報告されている。微生物型ロドプシンは光によって実際に多様な機能を発現するが、最も多いのが光のエネルギーを使って H^+ や Na^+ 、 Cl^- などのイオンを能動輸送する光駆動イオンポンプである。

本領域で我々はその機能の柔らかさに着目し、特定のロドプシン機能をアミノ酸変異によって別のものに転換する機能転換研究を一貫して実施してきた。その結果、真正細菌の持つ三種類のイオンポンプの間で、自然界の進化を逆行する機能転換が容易に実行可能であることを報告した[1]。このことは祖先型の分子が持っている機能に重要な何らかの構造因子が子孫の分子

においても進化の過程で保存されていることを示唆しており、タンパク質機能の柔らかさを考える上で大きな意味があると考えられたが、その実体は不明であった。

そこで本論文では各機能を持つ野生型ロドプシンや機能が転換された変異体に対して詳細な構造情報を得るために、低温 FTIR 分光法による構造解析を行った。その結果、これら真正細菌型の三種類のポンプには、これまで H^+ ポンプ型ロドプシンにおいて特徴的なものであり、その機能に必須と考えられていたきわめて強い水素結合を形成する内部結合水[2]が存在することが明らかとなった（図 1, 2）。 H^+ ポンプに機能転換した Cl^- ポンプ変異体においても、きわめて強い水素結合を形成した水分子が観測されている。

今回の結果により、ロドプシンの機能転換を可能にする柔らかさを生み出す要因の一つとして、強い水素結合を持つ内部結合水の存在が明らかとなった。古細菌とは異なり真正細菌の場合、進化の過程で Cl^- や Na^+ を輸送するようになっても、この水分子は保存されていたのである。強い水素結合を形成する水分子の部位について本論文では、真正細菌のロドプシンで保存されているシップ塩基近傍のカルボン酸に水和した水分子がその候補であると議論しているが、部位の同定は今後の課題である。この研究は、本領域において我々が当初の目標として掲げたものであり、PCCP 誌の特集号に掲載できたことを嬉しく思っている。

[1] Inoue, K., et al. *J. Biol. Chem.* (2016), **291**, 9883.

[2] Muroda, K., et al. *Biochemistry* (2012), **51**, 4677.

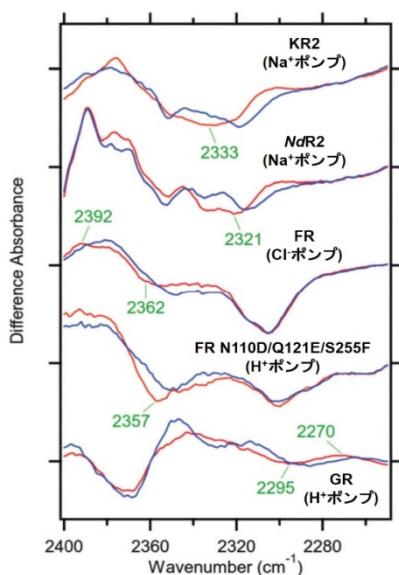


図 1. 様々な真正細菌型イオンポンプロドプシンの内部で最も強い水素結合を形成する水分子由來の O-D 伸縮振動（緑）

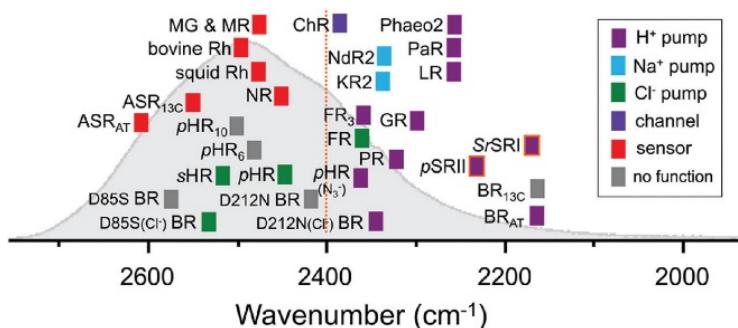


図 2. 各ロドプシンの暗状態において最も強い水素結合を形成する水の O-D 伸縮振動と機能との相関



業績紹介：塩化物イオンが我々の色覚にもたらす役割

片山 耕大（名工大・A03 計画研究連携研究者）

神取 秀樹（名工大・A03 計画研究代表者）

論文題目："In situ" observation of the role of chloride ion binding to monkey green sensitive visual pigment by ATR-FTIR spectroscopy"

著者：Kota Katayama, Yuji Furutani, Masayo Iwaki, Tetsuya Fukuda, Hiroo Imai, Hideki Kandori

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3381-3387 (2018).

我々が様々な色を識別できるのは、吸収極大波長の異なる 3 種類の色覚センサータンパク質が網膜に存在するからである。これらは全て同一の発色団分子 11-cis 型レチナールをもつが、オプシンと呼ばれるタンパク質部分がレチナールの電子状態を制御する結果、色の識別が可能になる。色覚センサータンパク質の中には、塩化物イオン (Cl^-) が結合すると吸収波長が長波長シフトするグループ (グループ L) がある。ヒトやサルの緑・赤センサータンパク質はともにグループ L に属し、遺伝子重複によって生まれた。従って、靈長類緑・赤センサータンパク質に対して Cl^- 結合部位の構造解析を行うことは、我々がいかに色を識別しているのかという波長制御の分子メカニズムに直接、関わるものである。

これまで我々は、培養細胞により発現させたサル緑・赤センサータンパク質に対し低温赤外分光法を適用することで構造解析を世界で初めて実現し、内部結合水やレチナールの振動モードの同定に成功した[1-3]。さらに最近、残された青センサータンパク質の赤外分光測定も行い[4]、3 種類 (青・緑・赤) すべての構造情報が出揃った。

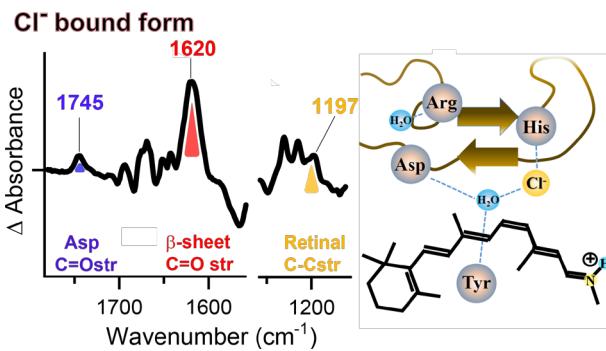
今回我々は、サル緑センサータンパク質に対し、エバネッセント波を利用して水溶液中でのスペクトル測定が可能な全反射赤外分光法を用いて、塩 (Cl^-) 存在下・非存在下での赤外差スペクトルを測定した。その結果、 Cl^- 結合型の振動バンドとして、典型的な β -シートの amide-I (1620 cm^{-1}) に対応する赤外吸収が観測された (図)。過去の部位特異的な変異タンパク質に対する紫外可視吸収スペクトル測定の結果から、タンパク質の細胞外側に存在する領域が Cl^- 結合サイトの一端を担うと報告されているため[5]、この領域が β -シートを形成するものと考えられる (図)。 Cl^- のタンパ

ク質内部への結合により β -シート構造が形成することで、緑色や赤色を吸収するレチナール発色団との特異な静電相互作用が実現したものと考えられた。 Cl^- や Br^- の結合が β -シート構造の形成や安定化に寄与する一方、イオンサイズの異なる硝酸イオン (NO_3^-) やヨウ素イオン (I^-) に対する同様の測定では同様のバンドが観測されなかったことから、異なる結合様式をもつことが明らかになった。

さらに今回 Cl^- の結合に伴い、タンパク質骨格の振動モードの変化に加えて、レチナールやプロトン化カルボン酸などに由来する構造変化を観測し、同定することができた (図)。これらは、重水やレチナールの同位体標識試料を駆使した測定により実現した。帰属に成功したレチナールの振動モードは C_{14} 、 C_{15} の単結合であったが、これはまさに低温赤外分光測定において緑・赤センサータンパク質に特徴的に観測されていた赤外吸収ピークであり[1]、 Cl^- がレチナールの C_{14} 、 C_{15} 近傍に結合することが明らかになった。

このように、イオン結合誘起赤外差スペクトル分光測定により、サル緑センサータンパク質の Cl^- 結合部位の構造情報を得ることができた。色覚センサータンパク質を含め、タンパク質構造の『柔らかさ』を追求することはまさにそのタンパク質の機能の真髄を解き明かすことであり、今後も色覚センサータンパク質の構造一機能関連研究に邁進してゆきたい。

- [1] K. Katayama et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 891 (2010).
- [2] K. Katayama et al. *Biochemistry* **51**, 1126 (2012).
- [3] K. Katayama et al. *J. Phys. Chem. Lett.* **6**, 1130 (2015).
- [4] K. Katayama et al. *Sci. Rep.* **7**, 4904 (2017).
- [5] Z. Wang et al. *Biochemistry* **32**, 2125 (1993).





業績紹介： π -共役ポリエンとパラジウム金属鎖の分子内界面に形成される連続多点 π -配位の結合性解明

村橋 哲郎 (東工大・A03 計画研究代表者)
山本 浩二 (東工大・A03 計画連携研究者)

論文題目："Contiguous multiple π -coordination of π -conjugated polyenes: bonding nature and charge delocalization behaviour of polyene-(palladium chain) sandwich clusters"

著者：Mariko Yamane, Mitsuki Yamashita, Koji Yamamoto, Tetsuro Murahashi

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 4287-4296 (2018).

連続多点 π -配位(CM π C)は π -共役系不飽和炭化水素類と金属クラスターとの間の分子界面において形成される結合であり(図1)、不飽和有機コンポーネントと金属コンポーネントを結合させて物質を構築する際に重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、CM π Cの結合性は十分に解明されていなかった。我々の研究グループは、 π -共役ポリエン配位子を多座架橋配位子として有する一次元金属鎖サンドイッチ錯体[Pd_m{Ph(CH=CH)_{m+1}Ph}₂][BAr^F₄]₂(m=3,4,5,6)を報告しており¹⁴⁾、これらは、連続多点 π -配位結合の性質を調べるための良好な一次元モデルを与える。今回、CM π Cの結合性について実験・理論両面から解明を進めた(図1)。その結果、① CM π C結合を通して、金属鎖と π -共役ポリエンの間で電荷の非局在化が効率的に起こること；② $\mu\text{-}\eta^2(\eta^2)\text{-}\eta^2$ -配位はcorner-sharing型のPd金属鎖として理解できるのに対し、 $\mu\text{-}\eta^3(\eta^2)\text{-}\eta^3$ -配位はedge-sharing型とcorner-sharing型の混合状態とみなせること；③ $\mu\text{-}\eta^2(\eta^2)\text{-}\eta^2$ -配位と $\mu\text{-}\eta^3(\eta^2)\text{-}\eta^3$ -配位のどちらのCM π C形式においても、Pd金属鎖は弱いM-M結合相互作用をもつことを明らかにした。

CM π C結合を介した電荷の非局在化は、[Pd_m{Ph(CH=CH)_{m+1}Ph}₂][BAr^F₄]₂(m=3,4,5,6)(錯体1-Pdm)の¹³C NMR測定によって明らかにした。ポリエン配位子のPh基が配位に直接関与しないことに着目し、その¹³C NMRケミカルシフト値の鎖長依存性を分析した結果、ケミカルシフトの変化方向が正電荷の非局在化により説明できることを明らかにした。

さらに、CM π C結合性を理解するために、モデル錯体[Pd_m{H(CH=CH)_{m+1}H}₂][BAr^F₄]₂(m=3,4,5)(1'-Pdm)および[Pd₃{H(CH=CH)₃H}₂(py)₂][BAr^F₄]₂(2'-Pd3)を用いて、2つのCM π C配位様式に関する分子軌道計算を行った(図2)。 $\mu\text{-}\eta^3(\eta^2)\text{-}\eta^3$ -型CM π Cをもつ錯体1'は、分子軌道解析により、

edge-sharing型とcorner-sharing型のハイブリッドとみなせることがわかった(図3)。corner-sharing型構造はCOがM-M結合に架橋配位した際に見られる構造であり、共役ポリエンのCM π CがCO架橋配位と類似性をもつことを示した。一方、 $\mu\text{-}\eta^2(\eta^2)\text{-}\eta^2$ -型CM π Cをもつ錯体2'は、corner-sharing型金属鎖として理解することができることも明らかにした(図3)。

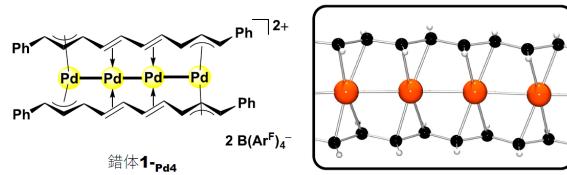


図 1. 連続多点 π -配位(CM π C)結合を有するポリエンーPd鎖錯体

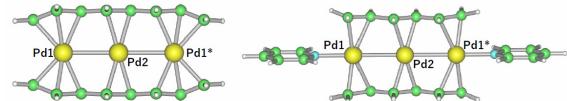


図 2. 錯体 1'-Pd3 (左図)と錯体 2'-Pd3 (右図)の最適化構造

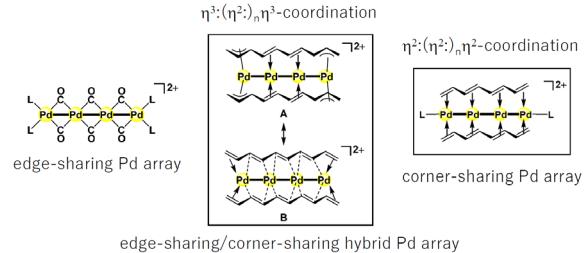


図 3. CM π C結合様式とポリエンーPd鎖錯体の幾何構造

本研究より明らかになった連続多点配位(CM π C)の結合性に関する知見は、不飽和有機基質と金属を分子内接合させて物質を構築していく際の重要な知見となると考えられる。

引用文献

- [1] T. Murahashi, H. Kurosawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10660-10661 (1999).
- [2] T. Murahashi, H. Kurosawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14288-14289 (2002).
- [3] T. Murahashi *et al.*, *Nature Chem.* **4**, 52-58 (2012).
- [4] T. Murahashi *et al.*, *Nature Commun.* **6**, 6742 (2015).



業績紹介：アルキル化ナフタレン液体の発光挙動に及ぼす位置異性体の効果

中西 尚志 (物材機構・A03 計画研究代表者)
高屋 智久 (学習院大・A02 公募研究代表者)

論文題目："The effect of regioisomerism on the photophysical properties of alkylated-naphthalene liquids"
著者: Bhawani Narayan, Kazuhiko Nagura, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, Akira Shinohara, Hideyuki Shinmori, Hao Wang, Quan Li, Xiaofeng Sun, Hongguang Li, Shinsuke Ishihara, and Takashi Nakanishi*

雑誌巻号: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 2970-2975 (2018). (Selected as 2018 PCCP HOT Article)

我々は、「アルキル-π」エンジニアリング技術として、 π 共役系分子に嵩高く、柔軟な分岐アルキル基を導入することで、 π 共役分子・色素間の相互作用を抑制し、融点が室温以下の液体物質の創成を行っている[1]。例えば、ピレンを発光ユニットとして、アルキル鎖の数や置換位置を変えた誘導体を合成し、高速分光や固体NMR解析などを駆使することで、ピレンの隔離度合い、液体粘性を制御・理解することに成功した[2]。

ここでは、 π 共役分子ユニットに比較的小さな分子骨格であるナフタレンを採用し、1-位ないし2-位に分岐アルキル鎖を導入した位置異性体を合成（モノ置換ナフタレンとしては、1-および2-異性体のみ）し、それらの溶媒フリーのニート状態における発光挙動ならびに液体物性等の検討を行った。また、分岐アルキル鎖には、2-ブチルオクチル（2-C₄C₈）、2-ヘキシルデシル（2-C₆C₁₀）、および2-オクチルドデシル（2-C₈C₁₂）の3種類を用い、アルキル鎖長に依存したナフタレンユニット間相互作用の阻害効果を検討した。

合成した全てのアルキル化ナフタレンは常温透明の液体であり、紫外光照射下青色に発光する。アルキル鎖長の増加に伴い、38.4~67.0 mPa s の間で液体粘性は増加した。汎用的なX線構造解析や偏光光学顕微鏡等の手法では、有意な構造ドメインのないアモルファス状態であることが明らかとなった。

一方、光学物性では、1-位異性体と2-位異性体で特異な違いが得られた。何れの系においても、溶液均一分散状態とニート液体状態の基底状態吸収スペクトルにはなく、ナフタレンユニットはモノマー様の状態と判断できたが、1-位異性体の蛍光スペクトルでは2-位異性体のものと比べて、エキシマー由来の成分がより顕著なスペクトルとなった（図1）。また、1-位異性体において、分岐アルキル鎖長を長くすることで、エ

キシマー成分は減少したことから、分岐アルキル鎖の嵩高さがエキシマー形成を抑制することが分かった。

励起状態のダイナミクスを詳細に検討するために、ピコ秒時間分解蛍光測定を行った。得られた解析結果を羅列すると、i) モノマー/エキシマー間の平衡時定数は位置異性体固有かつアルキル鎖長に依存する値（1-位異性体: 0.72~1.1 ns, 2-位異性体: 1.4~2.2 ns）となり、液体粘性との相関を示した。つまり、エキシマー形成は、分子の並進または回転拡散で律速されている。ii) 励起状態の寿命は位置異性体固有（1-位異性体: 10~11 ns, 2-位異性体: 15~16 ns）であり、アルキル鎖長には依存しない。iii) 1-位異性体のエキシマー形成割合は、2-位異性体よりも大きい。

また、MP2/6-31G(d)//B3LYP/6-311G(d,p)レベルの計算により求めた分子ダイポールは、1-位異性体が1.2421 Dに対して、2-位異性体では1.0843 Dと小さく、1-位異性体の方がエキシマー（ダイマー）形成の可能性が高いことが示唆された。

以上、非常にシンプルな位置異性体アルキル化ナフタレン液体において、モノマー発光とエキシマー発光の顕著な違いが生じる興味深い結果を得ることができた。この結果は、分子固有の電子構造、 π 共役分子・色素間の相互作用を精密に理解することで、新たな機能性分子液体の開発を可能とする有意な事例である。

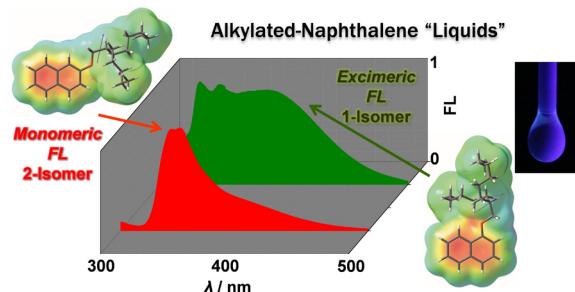


図1. アルキル化ナフタレン液体の1-位置異性体（エキシマー発光）および2-位置異性体（モノマー発光）の蛍光特性。

謝辞：本研究は、ケント州立大学のQuan Li教授らとの共同研究であり、当領域の国際共同研究の支援の下遂行された。

引用文献

- [1] A. Ghosh, T. Nakanishi, *Chem. Commun.* **53**, 10344 (2017). (Feature Article)
- [2] T. Takaya, I. Kawamura, T. Nakanishi, et al., *Sci. Rep.* **7**, 3416 (2017).

業績紹介：チオフェン縮環ヘリセンおよびヘリセン類縁体の合成と光学特性

中野 幸司（農工大院工・A03 公募研究代表者）

論文題目："Synthesis and properties of [7]helicene and [7]helicene-like compounds with a cyclopenta[1,2-*b*:4,3-*b'*]dithiophene or dithieno[2,3-*b*:3',2'-*d*]heterole skeleton"

著者：Keisuke Uematsu, Keiichi Noguchi, and Koji Nakano

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3286–3295 (2018).

我々は、柔らかな分子系として、ベンゼン環が螺旋状に縮環することでねじれた構造を有するヘリセンに着目して研究をおこなっている。これまでに、フェナントレン二つとシクロペンタジエンもしくはヘテロール一つが縮環した[7]ヘリセンおよびその類縁体**1**を報告している。本論文では、それら[7]ヘリセンおよび[7]ヘリセン類縁体の五員環に縮環するベンゼン環二つをチオフェン環に置き換えた化合物**2**を設計し、光学特性に及ぼす効果について評価した（図1）。

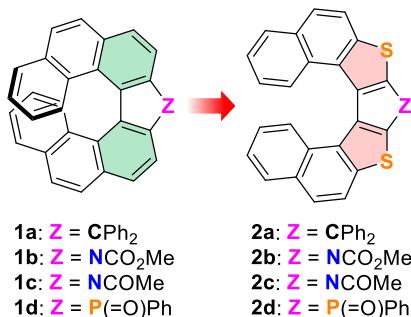


図1. [7]ヘリセンおよび[7]ヘリセン類縁体

合成した化合物**2**の紫外可視吸収スペクトルを比較したところ、中央の五員環がピロール（**2b**, **2c**）、シクロペンタジエン（**2a**）、ホスホールオキシド（**2d**）となるにつれて長波長シフトすることが分かった（図2a）。この傾向は、対応するベンゼン類縁体**1**と同様であった。また、化合物**2**とそれぞれに対応する化合物**1**の比較から、中央の五員環の構造に関わらず、**1**のベンゼン環二つをチオフェン環に置き換えることで吸収スペクトルが短波長シフトすることも分かった。これは、ベンゼン環がチオフェン環に置き換わることで、共役系の拡がりが抑制されたためと考えられる。

蛍光スペクトル測定では、シクロペンタジエンが縮環した化合物**2a**は、対応するベンゼン類縁体**1a**に比べて短波長シフトしたスペクトルを与えた（図2a）。また、ピロールが縮環した化合物**2b**と**2c**の極大発光

波長も、対応するベンゼン類縁体**1b**と**1c**に比べて短波長側にシフトした。一方、これらピロールが縮環した化合物のうち、アセチル基が縮環した化合物**2c**では、長波長側にもう一つの発光帯が観測された。また、この第二の発光帯は、溶媒の極性の増大に伴って長波長シフトする正のソルバトクロミズムを示した（図2b）。したがって、この第二の発光帯は、チオフェンが電子ドナー、アセチル基が電子アクセプターとして機能したことによる分子内電荷移動に由来すると考えられる。なお、このような第二の発光帯は、対応するベンゼン類縁体**1c**では観測されない。ホスホールオキシドが縮環した化合物**2d**は、化合物**2a**～**2c**および対応するベンゼン類縁体**1d**に比べて大きく長波長シフトした蛍光スペクトルを与えた。この長波長シフトに関しては、チオフェンが電子ドナー、ホスホールオキシドが電子アクセプターとして機能したことによる分子内電荷移動に由来すると考えられる。

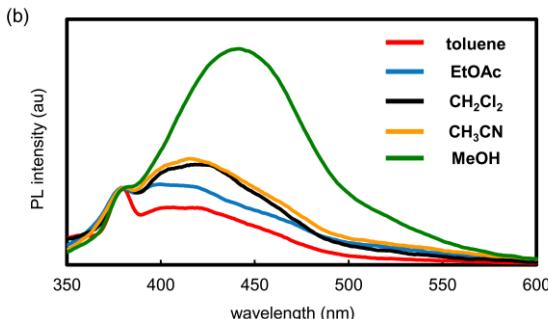
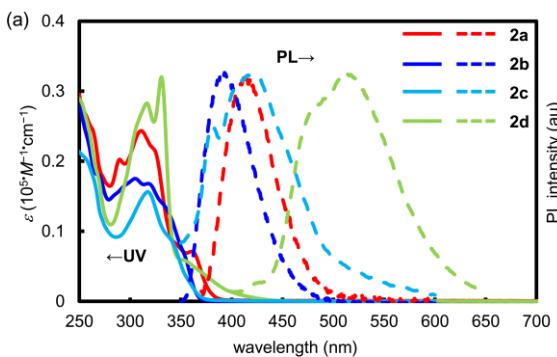


図2.(a) 化合物**2**の紫外可視吸収スペクトルと蛍光スペクトル、(b) 化合物**2c**の蛍光スペクトルの溶媒依存性

以上の結果は、縮環する芳香環やヘテロ環が光学特性に及ぼす効果を系統的に評価することで得られたものであり、今後のヘリセン分子の設計に重要な知見である。



業績紹介：有機金属錯体を内包したタンパク質マイクロ結晶の構造解析

安部 聰（東工大・A03 公募研究代表者）

論文題目："Structure of in cell protein crystals containing organometallic complexes"

著者：Satoshi Abe, Kohei Atsumi, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Hajime Mori and Takafumi Ueno

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, 20, 2986-2989.

近年、人工金属酵素の構築やメタルドラッグとタンパク質の相互作用の検討が可能なため、様々なタンパク質と金属錯体の複合体が合成されている。中でもこれらの複合体の結晶構造を明らかにすることは、人工金属酵素の反応機構や金属の配位構造を明らかにできるため、重要である。

一方で、タンパク質単量体が規則正しく集積したタンパク質結晶は、内部に機能性分子が固定可能な細孔空間を有しているため、近年固体材料として注目を集めている。例えば、触媒能を有する有機金属錯体をリゾリーム結晶内に固定化することにより不齊固体触媒の構築が可能になる。しかしながら、安定かつ大量に合成可能な金属錯体・タンパク質結晶複合体は、ほとんどない。そこで、我々は、金属錯体・タンパク質結晶の複合体合成に細胞内で自発的に結晶化する多角体タンパク質に着目した。

多角体結晶は、ウイルスに感染した昆虫細胞内で合成されるタンパク質の結晶であり結晶化の際にウイルスを内包する。乾燥、有機溶媒に高い耐性と極めて高い安定性を示し、これまでに結晶内に酵素を内包した酵素の安定保存や細胞内の分子吸着を可能にする結晶内細孔構築などを実現してきた[1,2]。本研究では、多角体内部に金属錯体を固定化しその構造を明らかにするとともに、多角体タンパク質の分子界面に存在するループ領域を欠損した変異体結晶を利用することにより、金属錯体の固定化制御を達成した。多角体結晶は 5 マイクロ以下の微小結晶のため、マイクロビームでの X 線構造解析を行った。

具体的には多角体タンパク質の分子界面に位置する L4 ループを形成するアミノ酸残基のうち三つのアミノ酸残基(192-194 番目のアミノ酸)を欠損した変異体結晶 (Δ L4PhC) を設計、合成した。この結晶は、野生型結晶 (WTPhC) のパッキングを維持したまま、結晶化する。

WTPhC、 Δ L4PhC と $[Pd(allyl)Cl]_2$ 錯体 (50 mM) をアセトニトリル溶液で 24 時間 37 °C で混合したのち、PBS で洗浄することにより、Pd(allyl)錯体を固定化した多角体結晶を作成した（図 1）。まず、ICP-MS と結晶サイズを測定することにより、多角体タンパク質あたりの Pd(allyl)錯体の固定化数を検討したところ、WTPhC では 6.9 個、 Δ L4PhC では、5.1 個の Pd 錯体が固定化されていた。また、SEM-EDX 測定では、Pd 錯

体は結晶全体に分布していることが示された。

Pd(allyl)•WTPhC、Pd(allyl)• Δ L4PhC の結晶構造を SPring-8 BL32XU で測定したところ、Pd 錯体の固定化が観察され、Pd(allyl)• Δ L4PhC では Pd(allyl)•WTPhC ではみられない結合サイトが存在した（図 2, 3）。また、Pd(allyl)• Δ L4PhC は、電子密度がディスオーダーしており、構造が決定できない箇所があり、Pd 錯体の固定化によりタンパク質領域が大きく揺らぐことが示された。今後、これらの複合体を利用することにより、結晶内触媒反応が可能と考えられる。

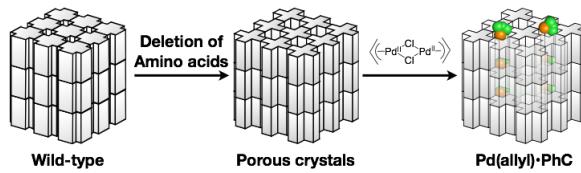


図 1. 多角体結晶への Pd(allyl)錯体の固定化

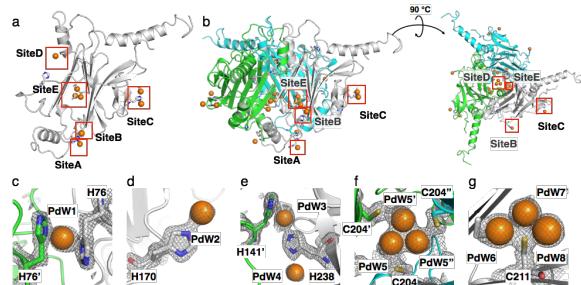
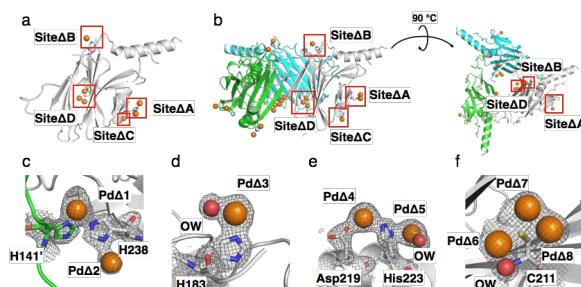


図 2. Pd(allyl)•WTPhC の結晶構造、(a) 単量体構造、(b) 三量体構造、(c-g) Pd 結合サイト

図 3. 図 2. Pd(allyl)• Δ L4PhC の結晶構造、(a) 単量体構造、(b) 三量体構造、(c-g) Pd 結合サイト

引用文献

[1] S. Abe et al., *Adv. Mater.* 2015, 27, 7951-7956.[2] S. Abe et al., *ACS Nano* 2017, 11, 2410-2419.



業績紹介：単独ドメインから成るタンパク質 APOBEC3GC 端ドメインはストランド間移動する能力を有する～実時間 NMR 計測法を用いた酵素活性測定の応用

神庭 圭佑 (京都大・A03 公募班・研究協力者)
永田 崇 (京都大・A03 公募班・連携研究者)
片平 正人 (京都大・A03 公募班・研究代表者)

論文題目："The C-terminal cytidine deaminase domain of APOBEC3G itself undergoes intersegmental transfer for a target search, as revealed by real-time NMR monitoring"
著者 : Keisuke Kamba, Takashi Nagata, Masato Katahira
雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 2976-2981 (2018).

本論文では 1 本鎖 DNA に変異を導入するタンパク質 APOBEC3G (A3G) の C 端ドメインが、ある DNA 上から別の DNA に移動 (ストランド間移動) することを明らかにした。

A3G は HIV 等のレトロウイルスを不活性化する抗ウイルス因子である[1]。A3G は外来一本鎖 DNA 上の標的配列中のシトシン (C) を脱アミノ化しウラシル (U) に変換する活性を持つ。A3G は、高い DNA 結合能を持つが脱アミノ化活性を持たない N 端ドメインと、DNA 結合能は低い (解離定数 $100 \mu\text{M} \sim 1 \text{ mM}$ 程度) が脱アミノ化活性を持つ C 端ドメインから構成されている。1 本鎖 DNA 上に標的配列が複数存在する場合、A3G は 5' 端側にある標的配列ほど高い効率で脱アミノ化する ($3' \rightarrow 5'$ polarity) [2]。

片平研究室では、A3G 添加後の基質 DNA の NMR シグナル強度の径時変化を評価する「実時間 NMR 計測法」を確立し、 $3' \rightarrow 5'$ polarity が A3G が DNA 上をスライディング (一次元の拡散) する結果生じること[2]、リン酸骨格を介した静電相互作用がスライディングに重要であること[3,4]を明らかにした。本論文では実時間 NMR 計測法の更なる応用として、A3GC 端ドメインがストランド間移動するかどうかを評価した。

はじめに、5' と 3' 端近傍に一つずつ標的配列を持つ DNA (S_{38}) を基質とし、A3G C 端ドメインの脱アミノ活性を評価した。 S_{38} と A3G の濃度比を固定し、 S_{38} 濃度を上げると、 $3' \rightarrow 5'$ polarity が減少した。更に、 S_{38} と A3G C 端ドメインの濃度が一定の条件下で、標的配列を含まない競合 DNA ((dA)₃₈) を添加し活性測定を行ったところ (dA)₃₈ 濃度の増加に伴い、脱アミノ化速度は極大値を示した。この結果は、(dA)₃₈ から S_{38} に A3G

が移動することで S_{38} への A3G の結合が促進され反応速度が増大する一方で、(dA)₃₈ 濃度が上昇すると (dA)₃₈ 間のストランド間移動が増えることで S_{38} への A3G の結合が抑制され反応速度が減少すると解釈できる[図]。通常 (ストランド間移動が存在しない場合)、競合 DNA を酵素基質混合溶液に加えても、反応速度の上昇は起こり得ないため、上述の結果は A3GC 端ドメインがストランド間移動する能力を有することを示唆している。

ストランド間移動は、一般的には複数の DNA 結合界面をもつ、複数ドメインからなるタンパク質に特有と考えられている現象である[5]。A3GC 端ドメインは単独の構造ドメインから成ることから、本論文の結果は従来の知見を覆し得る発見であり、2018 PCCP HOT Articles に選定された。末筆ながら、海外渡航支援、若手招待講演等、私が本領域から頂いた多大な支援に感謝の意を表したい。

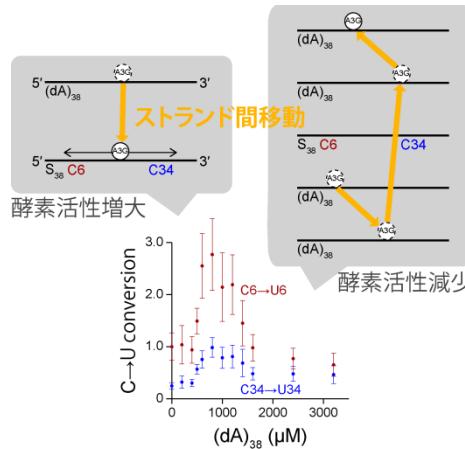


図. A3GC 端ドメインの脱アミノ化活性は非基質競合 DNA((dA)₃₈)濃度に対して極大値を示す。この結果は A3GC 端ドメインがストランド間移動することを示唆している。

引用文献

- [1] R. S. Harris and M. T. Liddament, *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 868-877 (2004).
- [2] A. Furukawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 2349-2352 (2014).
- [3] K. Kamba *et al.*, *PLoS One* **10**, e0124142 (2015).
- [4] K. Kamba *et al.*, *Front. Microbiol.* **7**, 587 (2016).
- [5] S. E. Halford and J. F. Marko, *Nucleic Acids Res.* **32**, 3040-3052 (2004).



業績紹介：ヒト生細胞中の DNA および RNA の NMR シグナル観測に初めて成功

山置 佑大 (京都大・A03 公募班 研究協力者)
永田 崇 (京都大・A03 公募班 連携研究者)
片平 正人 (京都大・A03 公募班 研究代表者)

論文題目："The first successful observation of in-cell NMR signals of DNA and RNA in living human cells"

著者 : Yudai Yamaoki, Ayaka Kiyoishi, Masayuki Miyake, Fumi Kano, Masayuki Murata, Takashi Nagata and Masato Katahira

雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 2982-2985 (2018)

核酸をはじめ、生体高分子の構造生物学的研究は専ら *in vitro* の希薄溶液環境下で行われる。しかし、実際にはこれらの分子は、細胞内という様々な生体分子が密に詰まった分子込み合い環境で働く[1]。このような細胞内環境下では生体高分子の性質は *in vitro* 環境下とは異なるのではないか? という問い合わせは現在も議論の真っただ中にあり、実際の生細胞内における核酸の構造や物性の詳細な観測が大きな課題となっている。

生細胞中に存在するこれらの生体分子の NMR シグナルを直接観測する in-cell NMR 法は、細胞内の分子に関して残基レベル、原子レベルの解析を可能にし、この課題解決のための有力な手法である。しかし、これまでの核酸を対象とした in-cell NMR 法による観測例は限られていたうえ、いずれもカエルの卵母細胞を用いたものであり[2]、ヒト生細胞中における核酸の NMR シグナルの報告は本研究が初めてであった。

我々は、細胞膜に細孔を形成する毒素蛋白質ストレプトリシン O (SLO)を用いた細胞への物質導入手法を高度化する事で、ヒト細胞中の核酸の in-cell NMR シグナルを観測する事に、世界で初めて成功した(図 1A、B)。今回、in-cell NMR 法により、DNA および RNA を導入した細胞の一次元 ^1H NMR スペクトルを測定し、細胞内の DNA および RNA のイミノプロトンシグナルを検出した(図 1B)。通常、核酸のイミノプロトンは水と交換しており NMR シグナルを与えないが、塩基対を形成している場合にはこの交換が抑えられ、シグナルが検出可能となる。つまり、イミノプロトンが検出されたことは DNA および RNA が細胞内において塩基対を形成していることを強く示唆している。さらに *in vitro* における NMR スペクトルとの比較により、細胞内においてヘアピン構造を維持していることも示した。

A) SLO 法による DNA/RNA のヒト細胞への導入

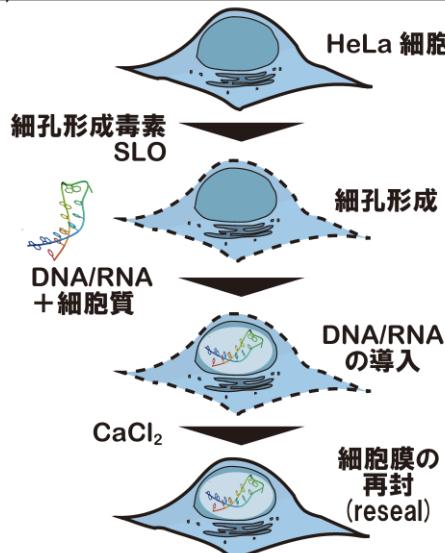
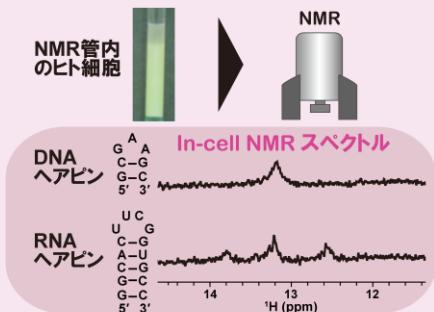
B) In-cell NMR 法による
ヒト細胞内 DNA/RNA の直接観測

図 1. SLO を用いたヒト生細胞への核酸の導入スキーム(A)。In-cell NMR 法によるヒト生細胞内核酸のイミノプロトンシグナルの検出(B)。

また、蛍光顕微鏡観察により、本手法で導入した核酸の大部分は核内に局在していることも明らかにした。これらの成果は本新学術領域の *Phys. Chem. Chem. Phys.* 特集号にて公表し、幸いなことに Hot Article にも選出していただいた。

DNA および RNA の両方に関してヒト生細胞内の NMR シグナルを検出できたことで、今後多様な配列、構造の核酸について細胞内の挙動を残基レベル、原子レベルの分解能で観測可能となることが期待される。

[1] Ellis *et al.*, *Nature*, **425**, 27-28 (2003).

[2] Hansel *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 15761-15768 (2009); Hansel *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 2816-2824 (2013); Salgado *et al.*, *Chem. Sci.*, **6**, 3314-3320 (2015); Bao *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5501-5511 (2017).



業績紹介：APOBEC3F の触媒中心近傍アミノ酸残基の役割と、DNA 配列・長さ及び pH が脱アミノ化活性に及ぼす影響

永田 崇（京都大学・A03 公募班・連携研究者）
片平 正人（京都大学・A03 公募班・研究代表者）

論文題目："Influence of the DNA sequence/length and pH on deaminase activity, as well as the roles of the amino acid residues around the catalytic center of APOBEC3F"
著者 : Li Wan, Takashi Nagata and Masato Katahira
雑誌巻号 : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3109-3117 (2018).

APOBEC3 ファミリータンパク質は、一本鎖 DNA (ssDNA) 上に存在するシトシンをウラシルに変換する脱アミノ化酵素であり、多くのウィルスに対する自然免疫の役割を担っている。その中で APOBEC3F (A3F) と APOBEC3G (A3G) は、HIV-1 に対して高い抗ウィルス活性を発揮する。HIV-1 は RNA ゲノムを持ち、細胞感染後、まず逆転写により ssDNA を生成する。A3F と A3G はこの ssDNA に作用する。結果、ウィルスゲノムに G/A hypermutation が導入され、その複製が阻害される。一方、HIV-1 は自身の持つ Vif タンパク質を使い、A3F と A3G をユビキチン・プロテアソーム経路に導き、これらを分解する。HIV-1 がこのように、A3F と A3G を返り討ちにするような機構をいつしか獲得した点は、広く興味が持たれている。また、Vif を阻害し、A3F と A3G を働かせることは、治療戦略として魅力的であり、近年注目されている。

我々はこれまで、A3G について NMR 法を用いて研究を行ってきた[1]。まず、立体構造を決定し、A3G 上の ssDNA 結合部位を明らかにした。その後、real-time NMR 法を用いて脱アミノ化活性を追跡し、それにより、A3G が標的とするのは、CCC (C が U に変換される)を中心配した 5' ネクレオチドであること、ssDNA 上に 2 ヶ所以上 CCC がある場合、A3G はスライディングにより CCC を探索し、5' 端に近いものほど効率良く脱アミノ化すること等を明らかにした。

今回紹介する論文では、A3F のキャラクタリゼーションを行なった。A3F は A3G とは異なり ssDNA 上の TC と C を標的とすることが知られていたが、核酸配列、長さの指向性や A3F の機能解析については研究が進んでいなかった。最大の理由として、A3F は凝集しやすく、濃度を高くすると沈殿してしまうことが挙げられ

る。事実、A3F 単独での結晶構造の報告があるが、11箇所の点変異が施されていた。今回我々は溶液条件を最適化し、また各種解析には低濃度の A3F (1 μM 程度) を使うことで上記の問題を克服した。そして、A3F の C → U 変換はウラシル DNA グリコシラーゼアッセイ法を、A3F と ssDNA の結合は蛍光偏光消法を用いた。複数の異なる配列をもつ ssDNA を用いて解析した結果、A3F は TC に隣接する塩基も識別し、TTCA/G 配列を好むことが明らかとなった。鎖長については、長い ssDNA (>20 nt) を短いものよりも好むことがわかった。

A3F についても複数の変異体を用いて上記の解析を行った。A3F の触媒中心(図, "Zn")は、複数のループに取り囲まれている(図)。その中で、loop 1, 3 と 7において、活性または ssDNA 結合能に重要な役割を果たすアミノ酸残基が見つかった。興味深いことに、触媒中心から離れた変異部位であるにもかかわらず、活性を低下させるが ssDNA 結合能には影響を及ぼさない、というものがあった(図、活性効率)。まとめると、A3F は、ループに形成された「柔らかい」表面の全体を使って、「柔らかい」ssDNA を結合し、TTCA/G 配列を認識し、脱アミノ化活性を発揮する、という描像が見えてきた。今後は、これらのループ上のアミノ酸残基がどのように連携して働くのか、その「柔らかさ」が活かされる分子機構について追求したい。

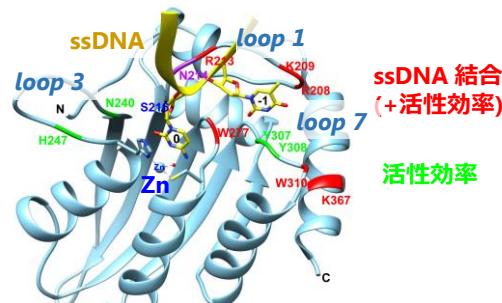


図 A3F の脱アミノ化活性を担うアミノ酸残基

引用文献

- [1] a) Furukawa *et al.*, *EMBO J.*, **28**, 440-451 (2009). b) Furukawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53**, 2349-2352 (2014). c) Kamba *et al.*, *PLoS One*, **10**, e0124142 (2015). d) Kamba *et al.*, *Front. Microbiol.*, **7**, 587 (2016).



業績紹介：ヘムタンパク質 6 量体を用いた複数の色素を含む人工光捕集系

大洞 光司（大阪大学・A03 公募研究代表者）
林 高史（大阪大学・A03 公募研究連携研究者）

論文題目："Successive energy transfer within multiple photosensitizers assembled in a hexameric hemoprotein scaffold"

著者：Koji Oohora, Tsuyoshi Mashima, Takashi Hayashi
雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3200–3209 (2018).

光合成系における天然光捕集系は、光子密度の低い太陽光で多電子酸化還元反応を実現するために極めて重要である。これまでに有機合成化学的あるいは超分子的に光増感色素を集積化し人工光捕集系が開発されている。またこの 10 年ほどでウイルスキャプシド等のタンパク質集合体に光増感色素を化学修飾すると、光捕集能を示すことが明らかにされている[1]。これらの研究に対して、我々のグループではヘムタンパク質 6 量体のユニークな構造に着目し、補因子であるヘムを光増感色素である亜鉛ポルフィリンに置換した再構成タンパク質が、超分子的に容易に調製可能な人工光捕集系として機能することを以前に報告した[2]。本論文では、さらに化学修飾法を適用し、亜鉛ポルフィリンを含めて、3 種類の色素からなる新規人工光捕集系を開発した。本系の特徴は、超分子的に結合した亜鉛ポルフィリンは決まった配向で整列し、そのドナーおよびアクセプター色素を 5 対 1 の比で化学的に結合させて、決まった比で色素集合化を実現した点にある。

亜鉛ポルフィリンのドナーおよびアクセプターとして機能する色素としてフルオレセインおよびテキサスレッドを選択した。またヘムタンパク質 6 量体にはシステインを導入し、マレイミド基を有するフルオレセインおよびテキサスレッドを反応させた。まず、6 分子のフルオレセインのみ導入した亜鉛置換ヘムタンパク質 6 量体は、60%ほどの効率でフルオレセインから亜鉛ポルフィリンにエネルギー移動することがわかった。続いて 1 分子のテキサスレッドのみを修飾した亜鉛置換ヘムタンパク質 6 量体では 35%ほどの効率で亜鉛ポルフィリンからテキサスレッドへエネルギー移動することが明らかになった。次に、1 分子のテキサスレッドと 5 分子のフルオレセイン、6 分子の亜鉛ポルフィリンを有するヘムタンパク質 6 量体を調製した

(Fig. 1)。まずジスルフィド結合を有する 2 量化 6 量体をサイズ排除クロマトグラフィーで単離し、フルオレセインの修飾、ジスルフィド結合の開裂を経て、ヘムを亜鉛ポルフィリンに置換した。同定は MALDI MS および吸収スペクトルにより行った。吸収スペクトルおよび励起スペクトルを比較し、エネルギー移動効率を評価した。この際、前述の 6 分子のフルオレセインあるいは 6 分子のテキサスレッドを有する光捕集系で得られた蛍光寿命、エネルギー移動効率および移動速度を近似的に割り当て、それぞれのエネルギー移動現象の速度を見積もった。結果として、フルオレセインからテキサスレッドに直接エネルギー移動するパス 1 と亜鉛ポルフィリンを介して移動するパス 2 の比は 39:61 であることを示した。このことから本系が連続的なエネルギー移動によりアクセプターに幅広い波長の光励起エネルギーを捕集可能な系であることが示された。

以上のように、タンパク質を足場として新規な光捕集系を構築し、その複雑な挙動を詳細に評価した。また推測ではあるが、修飾した色素の揺らぎが本系の効率に大きく寄与していることが示唆されており、その制御が、今後の高効率な光捕集系構築のヒントになると考えている。

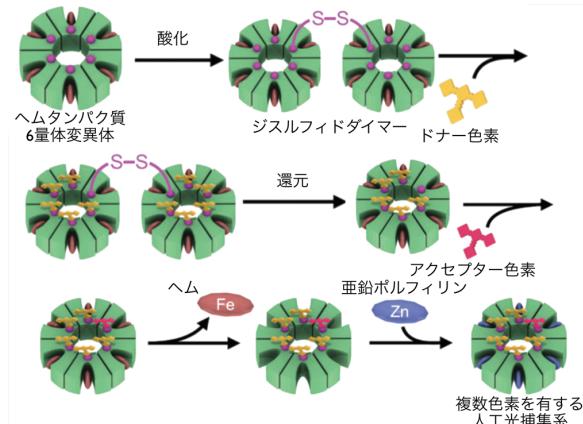


Fig. 1 光捕集系調製法の模式図。

引用文献

- [1] L. S. Witus, M. B. Francis, *Acc. Chem. Res.*, **44**, 774–783 (2011).
[2] K. Oohora, T. Mashima, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, T. Hayashi, *Chem. Commun.*, **51**, 11138–11140 (2015).



業績紹介：二次元性秩序構造を有するイオン液体中の三重項励起エネルギー拡散と フォトン・アップコンバージョン特性

久光 翔太 (九大院工・博士課程学生)
楊井 伸浩 (九大院工・A03 公募研究代表者)

論文題目："Two-dimensional structural ordering in a chromophoric ionic liquid for triplet energy migration-based photon upconversion"

著者：Shota Hisamitsu, Nobuhiro Yanai,* Hironori Kouno, Eisuke Magome, Masaya Matsuki, Teppei Yamada, Angelo Monguzzi and Nobuo Kimizuka*

雑誌巻号：*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, 20, 3233-3240.

π 共役系発色団はイオン液体(IL)中でどのように配列するのか？という疑問を追求した結果、上記の論文として報告するに至った。以前、発色団を有する IL 中での三重項励起エネルギー拡散を利用したフォトン・アップコンバージョン現象について報告した¹。この時に用いた分子について、2016年3月、久光が本領域の若手研究者海外派遣プログラムによりイタリアのミラノビコッカ大学で Monguzzi 博士との共同研究を行った際、液体中の発色団の集合構造が励起子ダイナミクスと密接に関連していることに気が付いた。この時点では、IL 中で三重項励起エネルギーの拡散が起こるほど発色団同士が近接していることは明らかであったが、詳細な分子配列については不明であった。

帰国後、準安定な過冷却状態を示す IL を用い、最安定な結晶相における結晶構造をもとにして液体状態での分子配列を議論できるのではないかという着想のもと実験を遂行した。発色団を持つアニオンには以前と同様に DPA スルホン酸を用いたが、カチオンにはアルキル鎖長を短縮したものを用いた(Figure 1a)。この分子設計により、室温における最安定相は結晶相であり、かつ一度融解すると準安定な過冷却液体状態を常温で長時間保つイオン対 P₂₂₂₁₄DPAS を得た。

単結晶 X 線構造解析により結晶構造を明らかにした (Figure 1b)。イオン性部位と非イオン性部位による層状構造を有しており、イオン性の層間距離は 23.1 Å であった。興味深いことに、この層間距離に対応する低角側の回折ピークは準安定な過冷却 IL 状態においても観測され (Figure 1c)、液体中において二次元性の秩序構造を保って分子が配列していることを明らかにした。

さらに、この低角側に現れた回折ピークの半値幅か

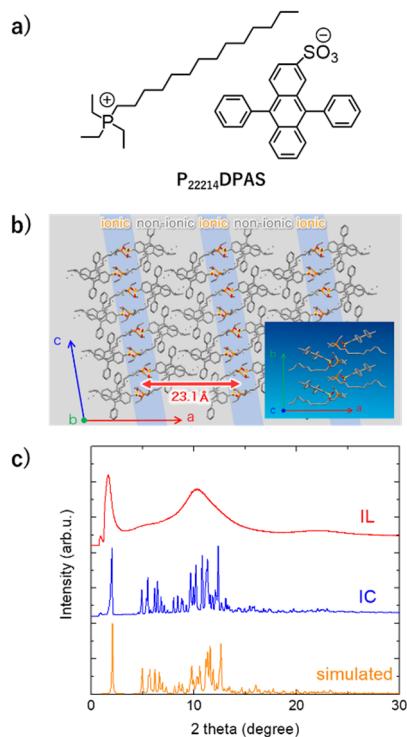


Figure 1 (a) 過冷却イオン液体 P₂₂₂₁₄DPAS の分子構造. (b) P₂₂₂₁₄DPAS の結晶相における結晶構造. (c) P₂₂₂₁₄DPAS の示した X 線回折パターン. 赤: 過冷却液体相, 青: 結晶相, オレンジ: X 線構造解析結果から予測されたパターン. (九州シンクロトロン光研究センターにて測定, 入射 X 線: 15 keV)

ら、シェラーの式よりドメインサイズを見積もり、液体中における三重項励起子拡散距離と比較した。興味深いことに、算出されたドメインスケール 9.3 nm に対し拡散距離は 21.1 nm であった。これは IL 中でドメイン同士の境界を越えて三重項励起エネルギー拡散が起こっているという描像を示している。

「イオン、液体。涼しそう」四年前、研究室配属時に IL を研究題材として与えられたときの印象であった。液体でありながら秩序性を持ち、また時に剛直たりうるこの材料は、学ぶほどに面白い題材であった。今後もこの分野の発展に寄与していきたい。今回の結果は、若手研究者海外派遣プログラムの派遣先である Monguzzi 博士との国際共著論文として PCCP 特集号に報告できた。今回の研究成果のきっかけを頂いた本領域のサポートにここで感謝申し上げます。

【引用文献】

- 1) S. Hisamitsu, N. Yanai, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54, 11550.



業績紹介：PaCS-MD による解離シミュレーションとマルコフ状態モデルを用いたタンパク質—リガンド複合体の結合自由エネルギー計算

TRAN Phuoc Duy (東工大生命理工・研究員)
竹村 和浩 (東大分生研・特任研究員)

北尾 彰朗 (東工大生命理工・A01 計画研究代表者)

論文題目："Protein–Ligand Dissociation Simulated by Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics"

著者:Duy Phuoc Tran, Kazuhiro Takemura, Kazuo Kuwata, and Akio Kitao

雑誌巻号：*J. Chem. Theory Comput.* **14**, 404-417 (2018).

PaCS-MD (Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics)は、並列に多数の独立な分子動力学計算を実行し、得られたトラジェクトリから初期構造を選択して新たな分子動力学を開始するというサイクルを繰り返すことで、立体構造空間を効率的にサンプリングすることができる分子シミュレーション法である[1,2]。PaCS-MD が効率的である理由は、次のサイクルの初期構造として構造分布の端にあるまれなゆらぎを選択することによって、構造転移を飛躍的に起こりやすくなっていることにある。これによって効率的な立体構造サンプリングを可能にし、通常の分子動力学では長時間のシミュレーションが必要な現象でも、短い実行時間で観察することを可能にする。この論文は、PaCS-MD をタンパク質—リガンド複合体の解離シミュレーションに応用し、多数の解離経路を生成するとともに、マルコフ状態モデルを応用することで、結合自由エネルギーの計算を可能にする方法論を発表したものである。

分子シミュレーションを用いて複合体の結合自由エネルギーを計算する方法は主に 2 種類に分類できる。1 つは、実験的には実行不可能な、小分子を消滅させる「鍊金術的」熱力学サイクルを想定し、自由エネルギー摂動法や熱力学積分法などを用いて結合自由エネルギーを計算する “Double annihilation” 法等の計算法である。もう一つは複合体の解離あるいは結合のシミュレーションを実行し、結合状態と十分遠距離に解離した状態との差として結合自由エネルギーを計算する方法である。前者は、既に長年様々な計算法が試されており、完成度が高い計算法であると言えるが、1 ステップあたりの変化量が摂動の範囲、すなわち熱ゆらぎ $k_B T$ 程度である必要があるので、大きな分子同士の

結合自由エネルギー計算に分子の消滅には多数回のステップが必要となり、タンパク質—タンパク質複合体のようなターゲットに適用するのは困難である。後者の場合、通常の MD 計算の時間内で解離や結合を観察することは難しいので、Steered MD (SMD)などのバイアスを導入することで解離や結合を促進する必要がある。しかし、これらのバイアスはしばしば不自然な構造変化を誘引してしまうので、正確な自由エネルギー変化を計算する上での障害になる。

我々は PaCS-MD をリゾチーム—triNAG 複合体の解離シミュレーションに応用することで、バイアスを付与することなしに、容易に解離現象を観察できることを明らかにした。更に得られたトラジェクトリをマルコフ状態モデルで解析することで、解離過程の自由エネルギープロファイルを計算し、結合自由エネルギーを得ることができることを示した。SMD ではバイアスの強さに自由エネルギープロファイルが大きく依存してしまう。また我々の方法は、アンプレラサンプリングを用いる方法と比較しても計算量が少なくできる。現在、この方法をタンパク質—ペプチド系等のより大きな系に応用している。

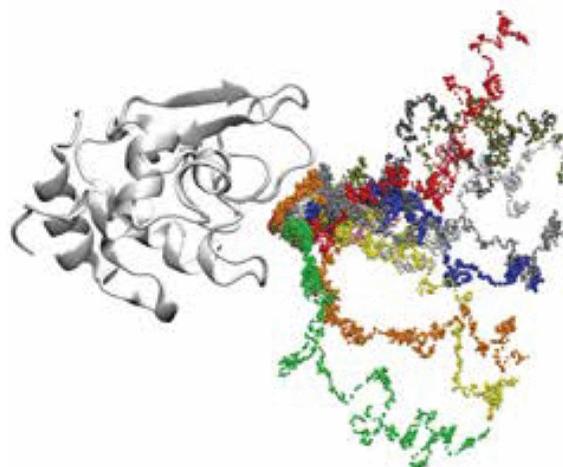


図 1 PaCS-MD で見た triNAG の解離経路

引用文献

- [1] R. Harada and A. Kitao, *J. Chem. Phys.* **139**, 035103 (2013).
- [2] R. Harada and A. Kitao, *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 5493-5502 (2015).



業績紹介：フェノール - 安もにクラスターの励起状態水素移動反応の反応機構

宮崎 充彦（東工大化生研・A02 計画研究分担者）
藤井 正明（東工大化生研・A02 計画研究代表者）

論文題目："Electron-Proton Transfer Mechanism of Excited-State Hydrogen Transfer in Phenol-(NH₃)_n (*n*=3 and 5)"

著者：Mitsuhiko Miyazaki, Ryuhei Ohara, Claude Dedonder, Christophe Jouvet, and Masaaki Fujii

雑誌巻号：*Chem. Eur. J.* **24(4)**, 881–890 (2018).

本研究では、フェノール - アンモニアクラスター (PhOH-(NH₃)_n (*n* = 3, 5)) におけるフェノールの光励起に伴う OH 基のラジカル開裂と水素原子のアンモニア溶媒への移動反応 (ESHT 反応) のメカニズムについて時間分解赤外・近赤外分光と量子化学計算により研究した。その結果、*n* = 3 では水素原子移動、*n* = 5 では電子 + プロトン移動と、異なるメカニズムで ESHT 反応が進行することがわかった。さらに、ポテンシャルエネルギー曲面 (PES) の形状と性質から、 $\pi\pi^*$ 状態と $\pi\sigma^*$ 状態の相互作用の強さが反応機構を制御していることがわかった。

水素移動反応は最も基礎的な化学反応であるがゆえに、その反応機構の理解は生体反応から燃料電池などの工業的に重要な反応まで幅広い領域でその重要性が認められる。我々のグループは、超音速ジェット中に生成した PhOH-(NH₃)_n クラスターを用いて OH 基からの水素原子移動メカニズムを研究してきた。最近、*n* = 5 における ESHT 反応中間体に対する電子遷移・NH 伸縮振動遷移の時間分解測定から、ESHT 反応が電子移動 + プロトン移動の二段階で進む可能性を見出した [1]。これまでの研究から、*n* ≤ 3 では電子とプロトンが水素原子としてまとまって移動することが明らかとなっているため [2]、どのように反応機構が変化するかに興味が持たれた。そこで、励起状態の PhOH-(NH₃)_n (*n* = 3, 5) の O-H 結合長に対する PES を CC2/aug-cc-pVDZ レベルの計算により求め、反応機構について検討した。

図 1 に得られた S₁ 状態と S₂ 状態の PES を示した。S₁ 状態の性質は、どちらのサイズにおいても OH 結合が短い領域 ($R_{OH} < 1.2 \text{ \AA}$) では $\pi\pi^*$ 状態の性質が強いが、OH 結合の伸長に従って $\pi\sigma^*$ 状態の寄与が増加し、 $R_{OH} \sim 1.3 \text{ \AA}$ の円錐交差領域後は反結合性の $\pi\sigma^*$ 状態となることは共通である。水素移動はこの反結合性状態

に沿って進行する。二つのサイズの PES を比べてみると、*n* = 3 では S₀ 状態の平衡 OH 結合距離 ($R_{OH} \sim 1.0 \text{ \AA}$) 付近における $\pi\pi^* - \pi\sigma^*$ エネルギー差が大きく、円錐交差点までの領域が $\pi\pi^*$ 状態の極小領域になっている。一方、*n* = 5 では、 $\pi\pi^* - \pi\sigma^*$ エネルギー差が小さいため、 $\pi\pi^* \cdot \pi\sigma^*$ 両状態が強く相互作用し、*n* = 3 で見られた極小点がなくなっている。実際 *n* = 5 では $R_{OH} \sim 1.0 \text{ \AA}$ においてすら $\pi\pi^* \cdot \pi\sigma^*$ 両状態の混合比がほぼ 1:1 であることが MO の形状を見る上で明らかとなった。このため、*n* = 5 では、光励起直後から $\pi\pi^* \cdot \pi\sigma^*$ 状態を区別することは妥当ではなく、励起された π 電子はアンモニア側へ半ば移動した形になると理解できる。さらに、励起状態の NH 伸縮振動強度の見積りから、プロトンが OH 基からアンモニア側へ移動している途中の状態では振動スペクトルに大きな強度変化が見られず、フェノキシラジカル (PhO[•]) と生成物 ($\bullet H(NH_3)_5$) の解離により $\bullet H(NH_3)_5$ が現われて初めて NH 伸縮振動強度が増強することが確かめられた。これらのことから、ESHT 反応機構は、 $\pi\pi^* \cdot \pi\sigma^*$ 状態のカップリングの強さと最終生成物の解離速度により、水素移動あるいは電子 + プロトン移動とメカニズムの変化が起こることが明らかになった。

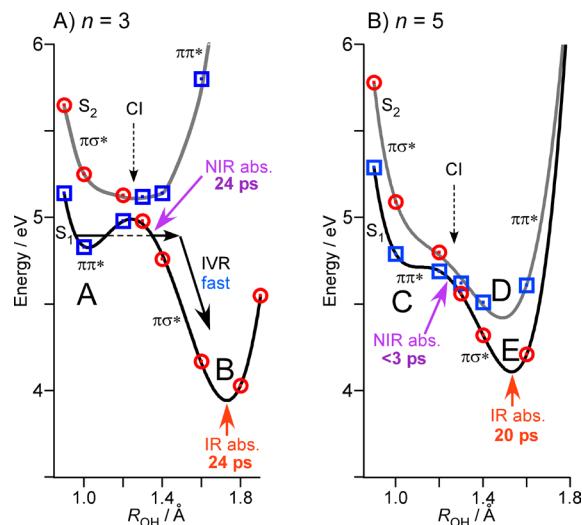


図 1. PhOH-(NH₃)_n (*n* = 3, 5) の S₁、S₂ 状態のポテンシャル曲面

引用文献

- [1] M. Miyazaki, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 15089 (2015).

- [2] S. Ishiuchi, et al., *J. Chem. Phys.* **127**, 234304 (2007).



業績紹介：超高速分子ムービーのメイキング映像

水瀬 賢太 (東工大・A02 公募研究代表者)
藤本 路夢 (東工大・A02 公募研究協力者)
大島 康裕 (東工大・分子研・
A02 公募研究連携研究者)

論文題目："Direct imaging of laser-driven ultrafast molecular rotation"

著者: Kenta Mizuse, Romu Fujimoto, Nobuo Mizutani, and Yasuhiro Ohshima

雑誌巻号: *J. Vis. Exp.* **120**, e54917 (2017).

分子ダイナミクスの明瞭な可視化は、分子運動の深い理解と高度な利活用につながる。我々のグループでは超高速分子運動を可視化するイオンイメージング装置の開発を行ってきた。本領域研究の間に、これまでになかつた撮像手法に基づくイメージング手法を開発し、分子回転波束ダイナミクスについて、スナップショット的に観測することを可能にした¹。観測された分子ムービーには、運動の波動性・量子性をしめす節構造とその超高速な時間発展の様子がはっきりとえられ、我々の手法の有効性が示されている。この成果はすでに *Science Advances* 誌に掲載されているが、我々の論文を見つけた *Journal of Visualized Experiments* 誌の編集者より、新しい「分子運動撮影法」としてプロトコル論文としての掲載を薦められ、今回の出版に至った。この *Journal of Visualized Experiments* (通称 JoVE)は、世界初の動画論文であり、文章や図・写真だけでは伝わりにくい実験手法の実際を、動画として記録・編集し、出版とする点が最大の特徴である。我々のイメージング装置についても、装置の全体像や実験の詳細を示すのに、動画（分子ムービーのメイキング映像）という形式も一助になると考え、出版の招待に応じた。

本論文はプロトコル本文、装置・マテリアルリスト、実験動画から構成されている。まずプロトコル本文では、実験手法の詳細（装置リストの装置群をどのように操作するか、など）を箇条書きで記載している。このプロトコル本文を「台本」として、実験動画の撮影に入る。撮影には JoVE 誌の撮影に習熟したプロビデオグラファーが派遣され、台本に沿った実験操作を行っていく。指定された撮影日に、限られた時間で実験可能な状態にしておくことが一つの困難であった。

図 1 に撮影日の様子を示すが、どんな実験操作なのか明確に伝わる動画にする必要があり、1 シーンあたりテイク 2~3 での撮影だった。



図 1 “メイキング映像”的撮影風景。

図 2 に撮影された動画素材の抜粋を示す。例えばダイヤルを回すだけのシーンから、pump-probe 光学系におけるマイクロメータの動かし方と遅延時間の関係、実際に実験中に見ている PC のスクリーンショットまで様々な要素を含んでいる。真空装置の中のように、どうしても動画化できない部分については本文の図での記載にとどまっているが、光学系のようにオーブンなものについては、光学素子マウント方法からマウントの型番まで提示しており、あたかも実験中の実験室を見学してもらったかのような情報を含めたつもりである。

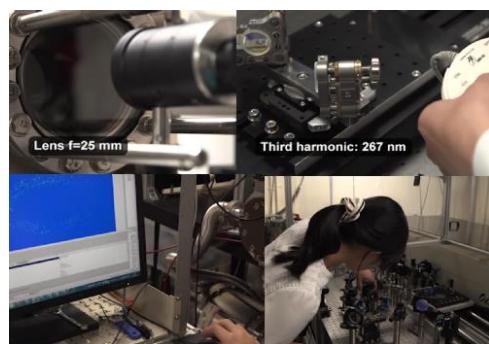


図 2 “メイキング映像”素材の抜粋。

今回、我々独自のイメージング手法の詳細やフェムト秒 pump-probe 光学系について、視覚的に理解しうる動画論文を出版した。本発表によって我々の手法が広く浸透、展開されることを期待するとともに、読者（聴者）の研究の参考になれば著者として幸いである。
引用文献

- [1] K. Mizuse, K. Kitano, H. Hasegawa, Y. Ohshima, *Sci. Adv.* **1**, e1400185 (2015).



業績紹介：高速原子間力顕微鏡/電子顕微鏡複合観察で明らかにされたダイナミン-アンフィファイジン複合体による膜切断機構

内橋 貴之 (名古屋大・A02 公募研究代表者)

論文題目：" Dynamic clustering of dynamin-amphiphysin helices regulates membrane constriction and fission coupled with GTP hydrolysis "

著者 : Tetsuya Takeda, Toshiya Kozai, Huiran Yang, Daiki Ishikuro, Kaho Seyama, Yusuke Kumagai, Tadashi Abe, Hiroshi Yamada, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Kohji Takei

雑誌巻号 : *eLife* 7, e30246, (2018)

エンドサイトーシスは、細胞が細胞外物質を細胞内に取り込む経路で、神經伝達やシグナル伝達、細胞接着、細胞運動など、様々な生命現象において重要な役目を果たす。エンドサイトーシスでは、細胞膜の限られた領域の陷入と膜狭窄部位の切断によって小胞が形成される。エンドサイトーシスのプロセスには数多くのタンパク質が関与しているが、その中でもダイナミンは膜の切断過程で特に重要な役割を果たしている。ダイナミンは GTP 加水分解酵素で、膜の狭窄部位にらせん状の複合体を形成し、GTP 加水分解に共役した構造変化によって膜を切断すると考えられている。ダイナミンの立体構造データに基づき、これまでに様々な膜切断モデルが提唱されていたが、実際のメカニズムは明らかになっていなかった。また、ダイナミンはアンフィファイジンなどの BAR ドメイン蛋白質と相互作用し、両者の協働によってエンドサイトーシスが進行するが、BAR ドメイン蛋白質によるダイナミンの機能調節機構についても明らかになっていなかった。

精製したダイナミン-アンフィファイジン複合体とリポソームを用いて膜切断過程を試験管内で再現し、脂質膜チューブに結合したダイナミン-アンフィファイジン複合体の構造と GTP の加水分解に共役した複合体の動的挙動を高速原子間力顕微鏡(AFM)と電子顕微鏡で解析した。その結果、脂質膜チューブに結合したダイナミン-アンフィファイジンのらせん状複合体は、GTP の加水分解に伴ってチューブに沿ってダイナ

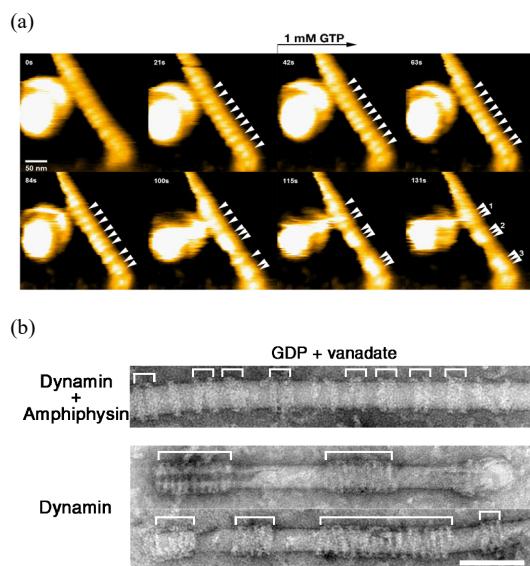


図 1 : (a) GTP 添加に伴ってクラスター化するダイナミン-アンフィファイジン複合体の高速 AFM 像。矢頭は、らせん状複合体の 1 ターンを示す。(b) アンフィファイジンによるクラスター調節。ダイナミン-アンフィファイジン複合体 (Dynamin+Amphiphysin) とダイナミン単独 (Dynamin) で形成されるクラスター構造 (括弧) の電子顕微鏡像。

ミックに動き、最終的に数個の複合体リングがほぼ等間隔に並んだクラスターを形成することがわかった(図 1 a)。さらに、クラスター両端の膜露出部位で膜の狭窄が起こる様子も見られた。このことから、複合体リングクラスターの両端で膜の切断が生じると考えられる。さらに、電子顕微鏡観察から、アンフィファイジンはクラスターの数や大きさを調節し、エンドサイトーシスにおける小胞形成を促進する機能を持つことを初めて明らかにした(図 1 b)。

本研究の成果は、エンドサイトーシスにおける膜切断機構の作用機序の解明だけでなく、ダイナミンやアンフィファイジンが関与する各種疾患の発症機序を分子レベルで解明することにつながることが期待される。



業績紹介：ヒトペルオキシレドキシン2の機能と構造の切り替えには負電荷資質が重要である

内橋 貴之 (名古屋大・A02 公募研究代表者)

論文題目：" Negatively Charged Lipids Are Essential for Functional and Structural Switch of Human 2-Cys Peroxiredoxin II "

著者 : Takamitsu Haruyama, Takayuki Uchihashi, Yutaro Yamada, Noriyuki Kodera, Toshio Ando, and Hiroki Konno

雑誌巻号 : *J. Mol. Biol.* **430**, 602-610 (2018)

2-Cys 型ペルオキシレドキシン (2-Cys Prx) は、活性酸素種である過酸化水素を分解するペルオキシダーゼとして機能する抗酸化酵素である。2-Cys Prx は、生体内でダイマーまたはリング状のデカマーといった低分子量オリゴマーとして存在し (図 1c 左)、2-Cys Prx の酸化還元状態によってオリゴマー状態が変化し、高分子量複合体を形成する。低分子量オリゴマーから高分子量複合体への構造変化は、ペルオキシダーゼからタンパク質の熱凝集を抑制する分子シャペロンへの機能変換をもたらすことが知られている。

2-Cys Prx の高分子量複合体への構造変化は、高濃度の過酸化水素による 2-Cys Prx の過酸化や熱処理、リン酸化、さらには 2-Cys Prx への ATP や ADP の結合など様々な要因によって引き起こされる。形成された 2-Cys Prx の高分子量複合体は、球状高次構造やリング状のデカマーがスタッツしたダブルリング、あるいは纖維状高次構造を示す。多くの研究によって、2-Cys Prx の構造-機能相関は明らかになりつつあるが、構造と機能の切り替えの分子機構については不明な点が多い。本論文では、生化学的手法と高速 AFM を組み合わせて、ヒト由来の 2-Cys PrxII (hPrxII) の機能と構造の切り替えのメカニズムを明らかにした。

過酸化した hPrxII は、安定なリング状のデカマーやリング状デカマーがスタッツした纖維状高次構造を示し (図 1a)、これらはペルオキシダーゼ活性やシャペロン活性を示さなかった。一方、ATP あるいは ADP が結合した hPrxII は球状高次構造を形成し (図 1b, 2.0 s)、この複合体はシャペロン活性のみを示した。さらに、

この球状複合体を観察中に AFM 探針からの荷重を大きくして壊したところ、基板上にシート状の構造物が現れた (図 1b, 4.6 s)。この構造物は形状と高さなどから、発現に用いた大腸菌の由来の脂質二重膜の可能性が高く、hPrxII の球状高次複合体の形成に脂質が関与していると考えた。

次に、細胞膜の主成分であるリン脂質 (PG, PE, PS, PC) と ADP を用いて hPrxII の球状高次複合体の形成を調べたところ、負電荷脂質である PS と PG のみでシャペロン活性を持つ球状高次複合体が形成された (図 1c 右)。また、PS あるいは PG が結合した hPrxII は、ADP が結合していない状態でもシャペロン活性を示し、それはヘキサマー構造を示した (図 1c 中央)。

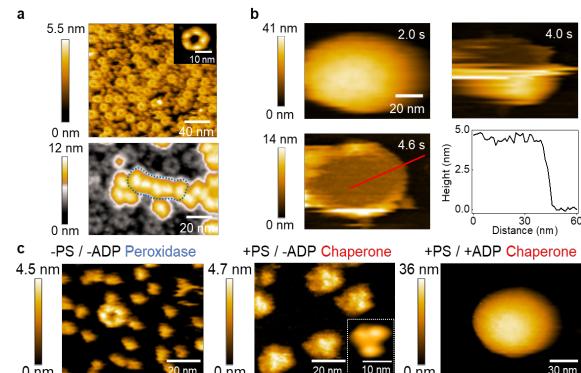


図 1 : (a) 過酸化した hPrxII の構造 (b) ADP 結合で形成された hPrxII 球状高次構造複合体の破壊 (c) PS と ADP の hPrxII への結合が引き起こす hPrxII の構造と機能変化。

これらの結果から、様々な要因で引き起こされる 2-Cys Prx の多量体構造形成とそれに伴う機能変換は本質的に負電荷性脂質膜との高次複合体形成に起因することが明らかになった。酸化ストレスによって増加した負電荷脂質が、hPrxII の構造とペルオキシダーゼ／分子シャペロン機能を切り替えることを示唆しており、分子の機能が細胞の状況に応じて柔軟に変化することを示している。



業績紹介：タンパク質結晶からタンパク質ケージを切り出す

安部 聰（東工大・A03 公募研究代表者）

論文題目："Supramolecular protein cages constructed from a crystalline protein matrix"

著者：Hashiru Negishi, Satoshi Abe, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Kento Niwase, Marion Boudes, Fasseli Coulibaly, Hajime Mori and Takafumi Ueno

雑誌巻号：*Chem. Commun.*, 2018, 54, 1988-1991.

天然では、タンパク質は単量体が自己集合することにより超分子構造体を形成し、機能を発現している。近年、それらのタンパク質超分子構造体に着目し、タンパク質分子界面の設計により、ボトムアップ的に超分子構造体を構築する研究が多数報告されている。しかしながら、溶液中で超分子構造体を構築する場合、タンパク質会合の平衡を考慮し、非特異な集積を避ける必要があるため、単一な構造体の構築は未だ課題である。そこで、本研究では、タンパク質結晶内に構築されるタンパク質集合体をそのまま溶液中に切り出す、新しいタンパク質超分子構造体の構築手法を開発した。

本研究では、細胞内で形成する「多角体」とよばれるタンパク質結晶に着目した。多角体結晶は、昆虫ウイルスによって感染した細胞内で産生される多角体タンパク質によって形成される結晶で、3 量体をビルディングブロックとして形成され、酸、乾燥、凍結などに対して結晶性を維持する高い安定性を有する。一方、溶解すると単量体に分解する。そこで、多角体結晶内で形成される 3 量体からなるケージ構造を溶液中へ切りだすために、結晶内で単量体同士をジスルフィド結合により架橋化し、結晶を溶解し、ケージ構造を溶液中に切り出した（図 1）。

ケージ構造を結晶内で構築するために、単量体同士がジスルフィド結合形成可能な E73/Y83 および S193/A194 へシステインを導入した、C73C83/C193/C194、C73/C83、C193/C194 の 3 種類の変異体を作成した。設計したこれらの変異体は、昆虫細胞内で結晶を形成した。ジスルフィド形成は、これらの結晶を過酸化水素を含む水溶液に浸漬することにより行なった。続いて結晶構造解析を行なった結果、システイン導入、酸化反応によるジスルフィド結合形成をおこなっても結晶系や全体構造に変化ないことがわかった。また、酸化後の構造では、システイン残基の側鎖が構造変化し、ジスルフィド結合が形成されていることを明らかとした（図 2）。

結晶内に形成したケージ構造を溶液中に切り出すために、結晶を塩基性溶液により溶解した。透析後、切り出した溶液を SEC により精製し、MALDI-TOF MS、TEM、AFM、CD など各種測定によりケージ構造体を同定した結果、ケージ構造を観測でき、結晶を利用し

た超分子構造体を作成した（図 3）。一方、結晶溶解後、溶液中で単量体を架橋化すると、ランダムな架橋による凝集体が形成され、ケージ構造は形成されなかった。また、多角体の高い安定性を利用することにより 4 日間乾燥させた変異体結晶からもケージ構造の切り出しが達成された。これらの結果は、結晶内の適切な部位にシステインを導入し、架橋化し溶解することが超分子構造体を構築することに必須であることを示している。本手法は、様々なタンパク質結晶に応用でき、ケージのみならず、リングやシート、チューブ構造体を切り出す新しい超分子構造体の合成手法を確立した。

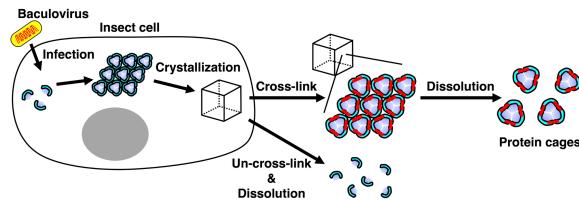


図 1. 細胞内結晶多角体の合成と結晶内架橋化と溶解によるケージ構造の構築

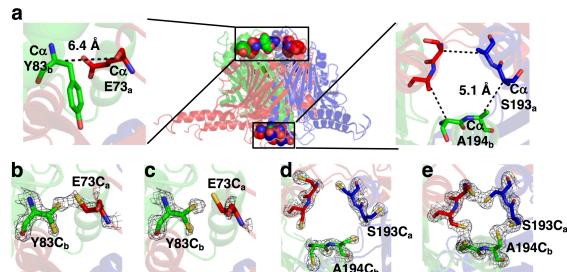


図 2. (a) ケージ構造構築のための分子設計、(b, d) 変異体のシステイン導入部位の構造、(c, e) 酸化反応後のシステイン導入部位の構造

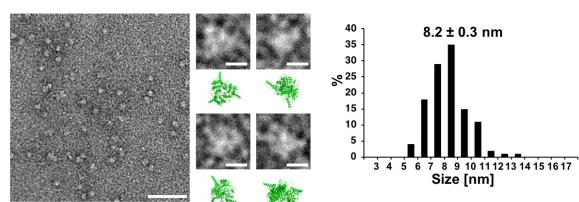


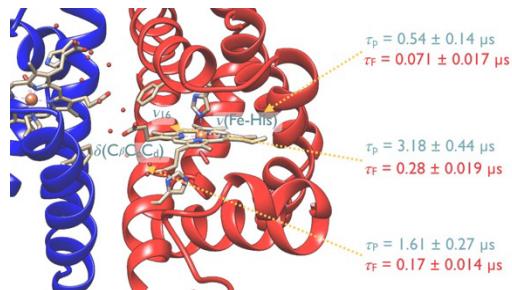
図 3. ケージ構造の電子顕微鏡イメージとヒストグラム



KAIST Ihee 研究室との国際共同研究報告

石川 春人（阪大院理・A02 計画研究分担者）

本新学術領域研究の国際共同研究のための研究者派遣・招へい資金制度により、2018年2月1日から二泊三日の日程で KAIST の Ihee Hyotcherl 教授の研究室を訪問しました。現地でのセミナーおよび共同研究に関する議論について報告いたします。



HbI の立体構造と時間分解共鳴ラマン測定により得られた時定数。 τ_f は完全解離の時定数、 τ_p は部分解離の時定数を示している。

共同研究の目的はアカガイ由来ヘモグロビン(HbI)のタンパク質ダイナミクス解明です。HbI の特徴は、ホモ二量体の非常にシンプルな構造であるにも関わらず酸素や一酸化炭素(CO)の結合に伴いアロステリック制御を示すことです。Ihee 研究室は以前から溶液 X 線散乱を用いてタンパク質の研究を行っており、HbI のタンパク質のダイナミクスについても複数の論文を発表しています。ここで興味深い点は、二量体 HbI 活性中心のヘムに結合している CO が 2 分子とも完全に解離した場合（完全解離）と 1 分子のみ解離した場合（部分解離）では、高次構造のダイナミクスに違いが観測されたことです。しかし、サブユニット内部の構造変化については不明でした。

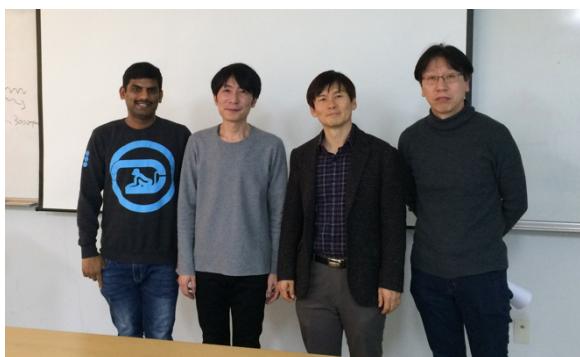
そこで、国際共同研究として HbI の時間分解共鳴ラマン測定を行い、CO の完全解離と部分解離の際のヘムに由来するバンドの時間変化を比較し、HbI のダイナミクスについて検討を行いました。その結果、ヘム鉄とそれに配位しているヒスチジン残基間の伸縮振動 $v(\text{Fe}-\text{His})$ バンド、ヘムの側鎖であるプロピオニン酸基を含む変角振動 $\delta(\text{C}_8\text{C}_6\text{C}_4)$ バンド、ポルフィリン内のピロール環の変形に由来する v_{16} バンドについて、完全解離と部分解離では速度定数に違いが観測されました。いずれのバンドについても部分解離の場合と比較して完全解離では時定数が約 10 倍程度まで遅くなる

ことが明らかになりました。これは溶液 X 線散乱での結果に矛盾しません。

CO 部分解離の時間分解共鳴ラマン測定から得られたそれぞれの時定数は、 $v(\text{Fe}-\text{His})$ が $0.54 \mu\text{s}$ 、 $\delta(\text{C}_8\text{C}_6\text{C}_4)$ が $1.61 \mu\text{s}$ 、 v_{16} が $3.18 \mu\text{s}$ でした。つまり、HbI に結合している 2 つの CO のうち 1 分子のみが解離した場合、まずヘム鉄に結合したヒスチジン残基が $0.54 \mu\text{s}$ で変化し、続いてプロピオニン酸基および周辺のアミノ酸残基が $1.61 \mu\text{s}$ の時定数で構造変化を起こすことを示しています。 v_{16} バンドの変化はさらに遅く、溶液 X 線散乱で観測された四次構造変化の時定数 $5.6 \mu\text{s}$ に非常に近い値を示しました。 v_{16} バンドの変化の由来は明確ではありませんが、ヘム周辺に何らかの構造変化が起きていることを示唆しており、四次構造変化のトリガーとなっている可能性が考えられます。

これらの結果をセミナーで発表し、Ihee 教授、研究室のボスドクおよび学生の方々と 2 時間近く様々な議論を行いました。特に構造変化の由来が明確ではない v_{16} バンドに関しては、CO の結合・解離に伴い二量体界面にフリップするフェニルアラニン残基の動きを反映している可能性について検討しました。このフェニルアラニン残基はアロステリック制御機構においても重要な役割を果たしていることが知られており、フェニルアラニン変異体の時間分解共鳴ラマン測定が今後の課題であることが明確となりました。

最後に、本研究の推進にあたり中心的な役割を果たした卒業生の田畠博章くん、また研究室スタッフの水谷泰久教授、水野操博士、および今回の国際共同研究にご支援頂いた新学術領域研究に感謝申し上げます。



セミナー・共同研究の議論の後で記念撮影。左から Srinivasan 博士、著者、Ihee 教授、Choi 博士。