

「光の利用と物質材料・生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成23年度終了研究課題－

研究総括 増原 宏

1. 研究領域の概要

本研究領域は光との相関を新しい光源から探ることにより、情報通信、ナノテクノロジー・材料、ライフサイエンス、環境・エネルギー等の諸分野において、これまでにない革新技術の芽の創出を目指す研究を対象とする。具体的には、光源として高出力、超短パルス、超長波長のレーザー、放射光、極微弱光、単一光子レベルの光も想定し、光の本質に迫る研究、光を使い尽くす研究、光でのみ可能になる合成・物性・機能の研究、光によって実現するプロセス、光に関わる細胞機能、光で初めて解き明かされる生体組織、光でのみ制御できる生命機能、これに加えてリアルな材料や生物を対象とした光計測法、イメージング法の研究などが含まれる。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は「光の利用と物質材料・生命機能」領域に委嘱された領域アドバイザー12名の協力を得て研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とした。
- 3) 光科学技術の研究は、光そのものに関わる科学技術を発展させるだけではなく、新しい物質システム、生命機能を生み出すメカニズムに関する概念や発想を与える。この光科学技術の特徴を踏まえた、今までにない斬新なアイデアによる研究を求めた。具体的には、数年から10年で新しい「光の利用」のストリームを作る可能性があるか、その代表者になれるか、実現可能性を示す手がかり、経験、あるいは背景はあるかを問う一方、他の研究費では実現できない研究として差別化出来ているか、個人研究であることを自覚しているかを考慮した。さらに、国際的にもさきがけていること、幅広い科学と技術の分野をカバーすること、年齢的にも地域的にもヘテロな分布とすることを重要と考えた。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	162件	25件	11件

備考:

- 1) 平成20年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価を実施しない。
 - ・永井健治研究者
研究期間が5年で、今年度終了しないため。
 - ・西村智研究者
内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム」への採択に伴い、同プログラムの規定により平成23年3月末をもって研究を終了したため。

5. 研究実施期間

平成20年10月～平成24年3月

6. 領域の活動状況

当研究領域では、物理から化学、生物、医学にいたるまで研究領域が広く、研究実施状況の把握が困難で、また適切な助言・指導ができない可能性がある。そのため、各研究者に対して1～3名のアドバイザーに「担当アドバイザー」を努めていただき、担当アドバイザーには研究総括が技術参事や事務参事と研究者を訪問する「サ

イトビジット」に同行いただいた。さらに各研究者からの半期ごとの進捗報告書も見ていただき、毎回コメントをいただいた。以下は主要な領域活動である。

1) 領域会議: 以下の通り7回実施した。

- ・第1回領域会議 奈良、平成21年1月11日(日)～12日(祝・月)
なら100年会館 小ホール
- ・第2回領域会議 札幌、平成21年6月27日(土)～28日(日)
札幌アспенホテル
*26日午後:北大、低温研&ニコンイメージングセンター見学
- ・第3回領域会議 静岡、平成22年1月9日(金)～10日(日)
ホテルアソシア静岡
- ・第4回領域会議 神戸、平成22年6月25日(金)～27日(日)
チサンホテル神戸
*25日(金):SPring-8 見学
- ・第5回領域会議 東京、平成23年1月6日(木)～1月8日(土)
チサンホテル浜松町
- ・第6回領域会議 新竹(台湾)、平成23年5月28日(土)
国立交通大学
- ・第7回領域会議 東京 平成24年3月8日(木)～10日(土)
東京大学・山上会館

2) シンポジウム(本研究領域や研究者が直接企画に関わった事例)

- ・2011 世界化学年記念 JST さきがけ研究領域合同シンポジウム
「人類の危機に挑む研究開発:光と太陽エネルギー」
2011年3月28日(神奈川大学)日本化学会
講演者:増原、深港、井村、高木、藤田
- ・日本薬学会特別シンポジウム
「生体反応・細胞挙動のセンシング—光を使って何ができるのか?」
平成23年3月29日(静岡)
オーガナイザー:樋口ゆり子、秋田英万
講演者:須藤、西村、樋口
- ・AS(Academia Sinica)-JST 合同シンポジウム「Innovative Use of Light/Bio Materials」
台湾中央研究院と科学技術振興機構との合同シンポジウム
平成23年5月26、27日(台湾、台北)
11名口頭発表、全員ポスター発表
- ・シンポジウム「若手研究者が拓く光生物物理学」
平成23年9月17日(兵庫県立大学)日本生物物理学会
オーガナイザー:須藤、増田
講演者:増原挨拶、須藤、増田、永井
- ・光拠点第4回合同シンポジウム
2011年11月14日(キャッスルプラザ、名古屋)
さきがけ「光の利用」からは、増原挨拶、研究者約30名がポスター発表
- ・JST さきがけ「光の利用と材料・生命機能」領域グループ企画
「光学が切り拓く分野横断研究」
2011年11月28日～30日(大阪大学)日本光学会
講演者:小関、佐崎、石坂、スミス、足立、新倉、岩倉、八ツ橋、志賀、増原挨拶
- ・JST さきがけ研究領域合同国際シンポジウム
「持続する社会を先導する光科学:環境・エネルギー・機能材料」
2012年3月26日(月)、27日(火)(日本化学会、慶応大学)
本領域では、増原挨拶、研究者3名の口頭発表、特別講演外国人 AD ヴァイス UCLA 教授
研究者:口頭発表3件、ポスター発表が15件、計18名が発表

3) 研究者自主企画による研究交流会

- ・「第1回一期生研究交流会」北海道大学
2011年3月13日(日)～14日(月)

- 参加者:一期生 11 名中 9 名、総括、技術参事、他 2 名
- ・「レーザーと光利用の夢物語」 奈良先端科学技術大学院大学
2011 年 7 月 1 日(金)～2 日(土)
- 参加者:一期生 4 名、二期生 5 名、三期生 4 名、総括、技術参事、他 1 名
- ・「第 2 回一期生研究交流会」 名古屋大学
2011 年 8 月 17 日(水)～18 日(木)
- 参加者:一期生 11 名中 10 名、総括、技術参事、他 2 名

4) 研究報告会(公開): 1 回

5) 研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問などは以下の通りである。

- ・ サイトビジット: 14 回 (総括、担当アドバイザー、両参事の研究実施場所訪問)
- ・ 総括面談: 第 5 回領域会議終了後に各研究者とそれぞれ 1 回、その他 8 回
- ・ 技術参事の研究実施場所訪問: 19 回
- ・ 技術参事面談: 2 回 (学会などで面談)

7. 評価の手続き

評価は、領域会議での発表内容(6 回実施)、アドバイザー・ミーティング(2 回実施)でのアドバイザーからのコメント、半期ごとの研究者から提出される半期報告書に対する担当アドバイザーからのコメント、第 5 回領域会議での個別面談、さらには終了半年前に実施した「終了検討会」と、その後折りを見て実施した面談、および各研究者より提出された研究課題別評価を参照して研究総括が実施。

(評価の流れ)

- 平成 23 年 1 月 領域会議終了後、各研究者と面談し最終年度の研究方針を確認
- 平成 23 年 5 月 領域会議終了後、アドバイザー・ミーティングにて各研究者の進捗状況などに関するコメントをいただいた。
- 平成 23 年 9 月 終了検討会を開催、最後の半年間における研究計画について議論、引き続き開催したアドバイザー・ミーティングでのコメントを踏まえて、その後必要に応じて個別面談を行った。
- 平成 24 年 3 月 研究報告会開催後、担当アドバイザーからのコメント
- 平成 24 年 3 月 研究者より研究報告書(案)受理
- 平成 24 年 3 月 研究期間終了
- 平成 24 年 4 月 領域活動・評価報告書および研究報告書提出

8. 評価項目

- (1) 研究計画書の目標に対する研究課題の達成度
- (2) 研究遂行にあたり示されたさきがけならではの独自性
- (3) 外部発表(学術論文、口頭発表など)、特許など研究成果の発信状況
- (4) 学術賞、学会招待講演、新聞記事発表など外部からの評価状況
- (5) 得られた研究成果の科学技術への貢献度

9. 研究結果

○ 井村孝平 研究者

「プラズモニック物質の波動関数の光制御とその応用」

貴金属ナノ構造は、光により自由電子の集団運動が励起されることからプラズモニック物質と呼ばれており、その特異な光電子特性からさまざまな応用が期待できる先進材料である。井村研究者は、プラズモニック物質の機能を光照射によりアクティブに制御することを目標にさきがけ研究を展開した。

具体的には、プラズモンの寿命程度の高い時間分解能をもつ近接場光学顕微鏡の開発を行うことにより、最高レベルの空間分解能と時間分解能が得られた。ワイヤ型や円盤型のナノ構造体におけるプラズモン波動関数を観察した結果、同様な形状(マクロな大きさ)に誘起される機械的振動モードに類似していることを明らかにした。また、プラズモニック物質の二光子励起過程を明らかにするとともに、その近接分子からのラマン散乱強度とプラズモンの寿命との相関を見出した。さらに、励起パルス光の波形制御により、プラズモンにより生成される光電場の空間分布を変化させることに成功した。

現在、プラズモン共鳴の研究は、基礎から応用にわたりきわめて広範囲に展開されているが、井村研究者は、さきがけて光によるプラズモニック物質の波動関数を制御することを提案し実証に成功した。達成された「プラズモニック機能を照射光によりアクティブに制御する」技術に基づき、独創的なナノ計測、反応制御へと展開していくことを期待する。

○ 岩倉 いずみ 研究者

「超高速分光による熱反応過程の直接観測と機構解明」

従来、超高速分光法を用いた反応初期過程の研究は、超短パルス光を利用した分子の電子状態励起後の反応過程を対象としてきた。岩倉研究者は、代表的な熱反応における遷移状態の直接観測と反応機構の解明を試み、新反応開発・機能性材料合成などへの有力な指針を得ることを目指した。

最低電子遷移エネルギーよりも低いエネルギーを有する近赤外可視光領域の波長からなる 5 fs パルス光をポンプ光として分子に照射すると、誘導ラマン過程により分子振動が励振され、熱反応と同等の経路で反応が進行する可能性がある。また、その反応途中で時々刻々と変化する分子振動を同じパルス光(プローブ光)を用いて調べることで、反応が進行している過程での分子結合の状態変化を通して、どのように構造変化しながら反応が進行するのかを解明することができる。この考えを実証するために、基本反応である熱クライゼン転位を選び実験を行ったところ、最初に C-O 結合が弱まりビスアリル型中間体が生成し、その後弱い C-C 結合が生成することで 6 員環イス型構造が形成され、さらに、C-O 結合開裂と C-C 結合生成が同時に進行する、3 段階過程を経由することが明らかになった。これは従来提案されていた機構とは異なる結果である。さらに、光クライゼン転位や、分子間反応の解析にも展開している。

一般の熱反応と同じなのか、熱反応とも光反応とも異なる反応なのか、詳細が解らない部分もあるが、超短パルス誘導ラマン光による基底電子状態における分子励起反応を提起した岩倉研究者の成果は、さきがけ研究にふさわしい内容である。レーザー励起反応の新しい概念の提案に向けて一層の研究推進を図ってほしい。

○ 太田 薫 研究者

「時空間波形制御技術の開発と微小空間領域での非線形分光計測への応用」

超短パルス光の振幅と位相を時間、空間両領域で同時に波形制御する新規手法を開発し、3 次非線形分光法と融合することにより、微小空間領域で新しい分光計測を行うことを目標とした。

波長が 500-700 nm でパルス幅が 15-18 fs の波長可変パルス光源システムを開発した。時間領域での波形制御には 1 次元液晶空間変調器と色収差を避けるため円筒ミラーを、空間領域での波形制御には 2 次元液晶空間変調器を用いることで、波面各部の位相制御を実現した。組み上げたシステムを用いて、散乱体を通じた散乱光を位相制御により任意の場所に集光できることを実証した。レーザーパルス光は、2 次元液晶空間変調器に導入後、散乱体に入射させ、CCD カメラで散乱光の強度分布を観測した。この際に、2 次元液晶空間変調器の画素の値と散乱画像の強度分布から伝送行列を計算し、その逆行列を求めることにより、必要な波面補正を 2 次元液晶空間変調器で行うことにより任意の場所に集光することが可能とする技術を開発した。

波面補償光学は天体望遠鏡や眼底検査などに実用化され、化学・生物などへ応用され始めている。散乱体の透過、反射条件下ではレーザー光の時空間特性は大きく変化するため、波面制御は極めて困難であり、計測等への応用はこれからという状態であり、時間と空間の両方を自在に制御する技術は未開拓領域として残されている。太田研究者の研究はまだ道半ばであるが、手がかりを作りつつあり、今後の大いなる発展に期待したい。

○ 佐崎 元 研究者

「不凍タンパク質作用発現機構の解明を目指したその場光観察」

極地の動植物を凍結から護る不凍タンパク質の作用機構は未だ想像の域を出ていない。本研究では、氷結晶表面上の単位ステップ(分子高さの段差)を見ることができ分解能でその場観察する光学顕微鏡技術を新たに開発し、氷結晶の表面ダイナミクスを直接観察を目指した。さらに蛍光ラベル化した個々の不凍タンパク質を直接観察することで、不凍タンパク質作用機構の解明を目標とした。

レーザー共焦点微分干渉顕微鏡の縦方向の感度を飛躍的に高め、気相から成長する氷結晶表面で単位ステップ(0.37 nm 高さ)を直接観察することに初めて成功した。さらに、氷結晶の表面融解過程の可視化にも成功し、互いに混ざり合わない 2 種類の表面液体相(疑似液体層)が生成することを発見した。また、融液相から成長する氷結晶表面での単位ステップ(水-氷界面の反射率はわずかに 0.007%)の直接観察にも、温度勾配型の観察用チャンバーを考案することで挑み、その結果、単位ステップと思われる画像を得た。当初の目的である不凍タンパク質の 1 分子観察にもチャレンジした。その結果、成長が停止した水溶液-氷結晶界面の形状

と蛍光像を同一視野中で直接観察し、不凍タンパク質が氷表面に吸着した場所で、氷結晶の成長が阻害されていることを確認している。

当初目的の不凍タンパク質の作用機構の解明は今後の課題として残されたが、光学顕微鏡の高分解能化により、これまで誰も見ることでできなかった氷結晶表面の成長や融解現象の観察に成功している。近い将来、不凍タンパク質の作用機構に迫る画像が得られるものと期待している。

○ 須藤 雄気 研究者

「光機能性・制御性蛋白質による細胞・個体操作」

須藤研究者は、さきがけ研究の提案時までに培っていたロドプシン分子の学理と技術を駆使して、細胞や個体を操ることを可能にするツールの開発を目標とした。

新しいロドプシンの探索においては、複数の微生物から新しいロドプシン分子を発見し、その精製に成功した。その中の1つは、分子進化を考える上で、光反応、発色団組成、機能分化について興味深い知見を与えるものである。光センサー型ロドプシンやイオンポンプ型ロドプシンの波長制御機構を解析し、そのメカニズムを明らかにすると共に、490-560 nm の波長変換を実現した。藍藻由来のロドプシンを用いて光によるタンパク質発現誘導システムを開発し、このシステムを大腸菌に導入することにより細胞の運動性制御が可能なこと、プロトンポンプ型ロドプシンを線虫に導入することにより個体の運動性制御が可能なることを実証した。

細胞内の転写活性を光で制御することにより、当初の目的である「光受容蛋白質で細胞機能を操作する」という手法を実証した。蛋白質は生命現象を司る根幹であり、須藤研究者が今回開発した手法は広範囲に応用が可能である。今後のさらなる展開により、生物学における光科学技術の高いポテンシャルを一層示されるものと期待している。

○ 高木 慎介 研究者

「分子間相対配置の操作による光化学過程の能動的制御」

本研究では、分子間相対配置を制御し思い通りの光化学過程を進行させ、“光をより有効に使い尽くす”ことを目的とした。ナノ層状化合物上における色素分子の配列・配向制御技術として提案してきた“Size-Matching Effect”を更に発展させ、色素分子間の相対配置を制御する事による、新奇な光化学過程の能動的制御技術の開発を目指した。

ナノ層状化合物である各種粘土鉱物(ホスト材料)を水熱合成し、透明分散溶液または透明膜を作製して、色素分子(ゲスト分子)と組み合わせた。ホスト材料を選択することにより、2.3 nm から 3.0 nm の範囲で平均分子間距離を制御できることを明らかにし、ホスト材料上の各色素間でエネルギー移動がほぼ 100%の効率で進行することを明らかにした。これにもとづき、粘土鉱物—ポルフィリン複合体が人工光捕集系構築に有望であることを示した。さらに、粘土鉱物上において、50°Cで1日加熱することにより、ポルフィリンが一部積層構造をとっていることを示し、三次元構造の構築が可能であることを提案している。

高木研究者は、粘土鉱物と色素分子との組み合わせにより、様々な構造、多様な機能が実現できる可能性を示すと同時に、粘土鉱物の酸化還元反応による構造制御、鋳型合成、単層膜化によるさらなる展開を図っており、我が国で芽生えた粘土系光化学として注目されている。

○ 新倉 弘倫 研究者

「軟X線レーザーによる時間分解分子軌道イメージング」

アト秒のパルス幅を持つ軟X線(XUV)レーザーを用いた時間分解光電子分光法、および時間分解・分子軌道イメージング法を開発し、化学反応途中の分子における電子準位や分子軌道の空間分布の変化を実時間測定することを目指した。

赤外の高強度レーザーパルスを気相の原子や分子に照射すると、軟X線高次高調波が発生する。アト秒の時間精度で赤外高強度レーザーパルス(基本波)の偏光方向を制御し、その関数として分子から発生した軟X線高次高調波の偏光方向を測定することで、 π_g 対称性を持つ二酸化炭素分子の最高占有軌道など、様々な分子軌道の対称性と広がりを測定する方法を開発した。また分子からの高次高調波の偏光方向は、分子軌道の空間分布や位相に依存することから、その変化を追跡することで分子軌道の変化をアト秒精度で捉えることが出来ることを示した。例として、トンネルイオン化に伴うエタン分子の分子軌道の空間分布の変化を、400 アト秒間にわたり直接測定し、世界にさきがけて報告している。

分子軌道の時間依存性を観測するための新しい時間分解分光法を提案し、実証したことは化学反応における分子軌道変化の直接測定に大きな一歩を踏み出したものと評価できる。

○ 深港 豪 研究者

「単一分子蛍光計測で探るキラリティーの本質」

分子のキラリティーの測定と分子構造との相関は化学研究者にとって歴史的に重要な課題の一つであり、近年は単一分子キラリティー計測が注目を集めている。本研究では、単一分子蛍光計測を応用し、円偏光励起単一分子蛍光検出および単一分子円偏光蛍光検出により単一分子のキラリティーを直接測定し、キラリティーの起源を検討することを目指した。

アーティファクトの影響がほとんどない蛍光検出円二色性(FDCD)計測系を構築する一方、優れた蛍光特性と大きなキラリティー応答を示す蛍光性キラリティー分子を合成した。光学分割した蛍光性キラリティー分子を高分子媒体中に固定し、単一分子 FDCD 計測を行った結果、同一のキラリティー分子を計測しているにも関わらず、分子毎に大小・正負と異なる幅広い分布をもったキラリティー応答を示し、その分布は各異性体間で鏡像の関係となることを見いだした。この分布はおもに薄膜中の分子配向の違いによって生じることが明らかとなり、理論的な解析によっても説明することができた。また、分子集団系では測定不可能なラセミ体についても、キラリティーを議論することが可能になることを示した。

信頼度の高い光学計測系の構築と、単一分子キラリティー計測に最適と思われる分子を合成し、当初の目的である「分子一つ一つのキラリティーの直接測定」を実現し、キラリティー応答は薄膜中の分子の向きに依存することを明らかにした。これはキラリティーの起源を化学的アプローチにより明らかにしたことになるものと評価できる。

○ 藤田 祐一 研究者

「光に依存した新規窒素固定酵素の創成」

ニトロゲナーゼは、窒素分子をアンモニアに変換する農業的に大変重要な酵素である。本研究は、クロロフィル生合成系の光に依存する酵素(光依存型プロトクロロフィリド還元酵素:LPOR)を改変することで、光に依存して反応する新規なニトロゲナーゼの創出を目指した。

LPORと同じ反応を光に依存せずに誘起する暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素(DPOR)の立体構造を解明し、ニトロゲナーゼとの共通構造基盤を明らかにした。これにもとづき LPOR を構造鋳型とする新規な光依存型窒素固定酵素創成の可能性を指摘した。光依存性の構造基盤となる LPOR の分子内ループを除き還元酵素としての基本構造のみを残した不完全な LPOR 遺伝子に、ランダムな DNA 断片を挿入することで新たな LPOR 創成を目指した。その過程で、*recJ* 欠損株の利用によるラン藻の高効率形質転換系の確立、終止コドン排除した合成 DNA 断片の設計など新たな基盤技術を構築した。これにより、これまで大腸菌などの従属栄養生物に限られていた酵素選抜系に光合成生物の系が加わり、新規な光依存型酵素の創成に向け可能性を大きく広げることができた。

当初目的である「新規なニトロゲナーゼの創成」に対しては、その一歩を踏み出したばかりであるが、暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素の立体構造を明らかにし、他にさきがけて反応機構を予測するなど、大きな一歩を達成した。

10. 評価者

研究総括 増原 宏 台湾国立交通大学 応用化学系及分子科学研究所 講座教授
奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 特任教授

領域アドバイザー氏名(五十音順)

石原 一	大阪府立大学大学院工学研究科 教授
伊藤 繁*1	名古屋大学 名誉教授
小原 實	慶應義塾大学理工学部 教授
熊野 勝文	東北大学マイクロシステム融合研究開発センター 客員教授
小杉 信博	自然科学研究機構分子科学研究所 教授
佐々木 政子	東海大学 名誉教授
七田 芳則	京都大学大学院理学研究科 教授
中島 信昭	豊田理化学研究所 フェロー
三澤 弘明	北海道大学電子科学研究所 所長
美濃島 薫	産業技術総合研究所 イノベーション推進本部 事務局長
三室 守*2	京都大学大学院人間・環境学研究科
宮脇 敦史	脳科学総合研究センター 副センター長
吉原 経太郎	首都大学東京大学院都市環境科学研究科 客員教授

Frans Carl De Schryver*3 Katholieke Universiteit Leuven, Emeritus Professor
 Din Ping Tsai*4 台湾中央研究院應用科學研究中心 センター長
 Shimon Weiss*5 University of California, Los Angeles, The Dean Willard Chair

- *1 平成 22 年 6 月～現在
- *2 平成 20 年 6 月～平成 23 年 2 月
- *3 平成 21 年 12 月～現在
- *4 平成 23 年 4 月～現在
- *5 平成 22 年 4 月～現在

(参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	8	61	69
口頭	100	63	164
その他	21	2	23
合計	129	127	255

※平成 24 年 3 月現在

(2)特許出願件数

国内	国際	計
1	0	1

(3)受賞等

- ・岩倉 いずみ 研究者
 日本化学会第 89 春季年会 優秀講演賞(2009 年 5 月)
 日本化学会第 24 回若い世代の特別講演会 講演賞(2010 年 3 月)
 PCCP Prize 2010(2010 年 3 月)
 BCS J Award Article(2011 年 7 月)
- ・佐崎 元 研究者
 日本結晶成長学会第 26 回 論文賞(2009 年 11 月)
- ・須藤 雄気 研究者
 光科学技術研究振興財団 研究表彰(2010 年 3 月)
- ・高木 慎介 研究者
 日本粘土学会 奨励賞(2009 年 9 月)

(4)招待講演

国際 46 件
 国内 22 件
 合計 66 件

「光の利用と物質材料・生命機能」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成24年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
井村 考平 (兼任)	プラズモニック物質の波動関数の光制御と その応用 (早稲田大学先進理工学部)	早稲田大学先進理工学部 准教授 (分子科学研究所 助教)	51
岩倉 いずみ (兼任)	超高速分光による熱反応過程の直接観測 と機構解明 (広島大学大学院理学研究科)	広島大学大学院理学研究科 助教 (日本学術振興会 特別研究員)	60
太田 薫 (専任)	時空間波形制御技術の開発と微小空間領 域での非線形分光計測への応用 (神戸大学分子フォトサイエンス研究センタ ー)	JST さきがけ研究者 (同上)	42
佐崎 元 (兼任)	不凍タンパク質作用発現機構の解明を目指 したその場光観察 (北海道大学低温科学研究所)	北海道大学低温科学研究所 准教授 (同上)	36
須藤 雄気 (兼任)	光機能性・制御性蛋白質による細胞・個体 操作 (名古屋大学大学院理学研究科)	名古屋大学大学院理学研究科 准教授 (名古屋大学大学院理学研究科 助 教)	45
高木 慎介 (兼任)	分子間相対配置の操作による光化学過程 の能動的制御 (首都大学東京大学院都市環境科学研究 科)	首都大学東京大学院都市環境科学研 究科 准教授 (同上)	40
新倉 弘倫 (兼任)	軟X線レーザーによる時間分解分子軌道イ メージング (早稲田大学先進理工学部)	早稲田大学先進理工学部 准教授 (カナダ国立研究機構 博士研究員)	55
深港 豪 (兼任)	単一分子蛍光計測で探るキラリティーの本 質 (北海道大学電子科学研究所)	北海道大学電子科学研究所 助教 (九州大学大学院工学研究院 助教)	38
藤田 祐一 (兼任)	光に依存した新規窒素固定酵素の創成 (名古屋大学大学院生命農学研究科)	名古屋大学大学院生命農学研究科 准教授 (同上)	40

研究報告書

研究課題名：「プラズモニック物質の波動関数の光制御とその応用」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：井村 考平

1、研究のねらい

貴金属のナノ構造体は、局在プラズモン共鳴と呼ばれる自由電子の集団電子振動の共鳴励起により、バルク状態とは異なる光物性を示す。例えば、プラズモン共鳴は、光電場をナノ構造体に効率的に閉じ込めるため、構造体近傍に増強光電場を創りだす。光増強場は、表面増強分光法をはじめ、ナノ光デバイスへの応用が期待されている。近年、プラズモンを利用する光学技術をプラズモニクス、その媒介となる物質をプラズモニック物質と呼び、応用研究が急速に進展している。

従来のプラズモン研究は、物質のもつポテンシャルを受動的(パッシブ)に利用することを目的としている。これを能動的(アクティブ)に制御することができれば、プラズモニック物質の機能やその応用範囲を格段に向上させることができる。プラズモニック物質のもつ高いポテンシャルは、プラズモン(集団電子振動)の動的、空間的な特徴と深い関わりがある。したがって、励起する光電場の時間特性、空間特性を制御することで、プラズモニック物質の機能を制御し、そのポテンシャルを最大限に引き出すことができる。本研究では、超短パルス光とパルス波形制御技術を用いて、プラズモニック光電場の時空間特性を機能化することを目的とした。また、それを計測技術や光反応制御に応用して、新しい原理や現象の探求を目指した。

2、研究成果

研究目標を達成するため4つの研究項目に取り組んだ。研究項目ごとにその成果を以下に述べる。

(1) 超高時間分解近接場光学顕微鏡の開発

プラズモニック物質には、共鳴エネルギーの異なる複数のプラズモン波動関数(モード)が存在する(図 1)。それらをコヒーレントに励起することができれば、単一プラズモン共鳴で実現される性質とは大きく異なる特性を誘起することができる。例えば、プラズモンモード間の相対位相や振幅を制御することで、プラズモンにより局在化される光電場の空間を制御することが可能となる。複数のプラズモンモードを自在に励起するためには、プラズモンの寿命(5-20 fs)程度以下のパルス時間幅をもつ励起光源が必要である。また、複数のプラズモンモードをコヒーレントに励起することで新たに実現される空間特性を評価するためには、回折限界以下の空間分解能を実現する光学顕微鏡が必要であ

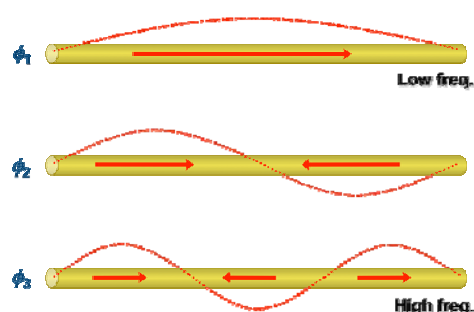


図 1. 棒状ナノ構造体に励起されるプラズモン波動関数の模式図(点線)。矢印は分極方向を示す。

る。つまり、本研究提案を実現しそれを評価するためには、時間と空間の両方の分解能を究極的に高めた顕微鏡の開発が不可欠である。従来、空間分解能と時間分解能を同時に高める方法として、モードロックチタンサファイアレーザーと近接場光学顕微鏡を組み合わせた装置が開発されていたが、その時間分解能はプラズモンの寿命よりはるかに長い100fs程度であった。

本研究項目では、プラズモンの寿命に迫る時間分解能を実現することを目標に、20 fs のパルス光源と開口型近接場光学顕微鏡とを組み合わせた装置の開発を行った。短パルス光は、光学部品を通過するたびに、その距離に応じてパルス幅が広がる。顕微鏡に使用されている光学部品によるパルス幅の広がりを補償することで、近接場光学顕微鏡の空間分解能を高く保ちつつ、20 fs 程度の高い時間分解能を達成することに成功した(図 2)。本性能は、現時点において世界トップクラスである。

(2) プラズモン波動関数のイメージング

プラズモン波動関数の制御を行うためには、まずプラズモン波動関数の諸特性を理解する必要がある。プラズモン波動関数の空間サイズは、通常の光学顕微鏡の空間分解能よりも小さいため、それを可視化するには近接場光学顕微鏡が必要である。本研究項目では、電子線リソグラフィ法を用いてガラス基板上に作製したナノ構造体(プラズモニック物質)を研究対象とし、その波動関数の可視化には、近接場透過スペクトルマッピング測定を用いた。

ワイヤ型のナノ構造体を用いた測定から、ワイヤ長軸に沿って振動する波動関数が可視化されることが明らかとなった。可視化される振動構造は、観測波長に依存し、短波長側から長波長側になるにしたがい振動周期が長くなった。この結果は、化学合成されたロッドにおいて観測されるプラズモン波動関数の特長と定性的に一致する。以上より、ワイヤにおいて観測される振動構造がプラズモン波動関数に帰属できることを明らかにした。この結果は、電子線リソグラフィ法で作製したナノ構造においても化学合成されたナノ構造同様、複数のプラズモンモードの励起が可能であることを示す。形状の異なるワイヤ型ナノ構造体を用いた観察から、ワイヤにおいて励起されるモードは、弦に励起される機械共振モードと類似した特性を示すことが明らかとなった。さらに、円盤形ナノ構造体についても同様の測定を行い、ナノ構造に励起されるプラズモン波動関数の可視化を行

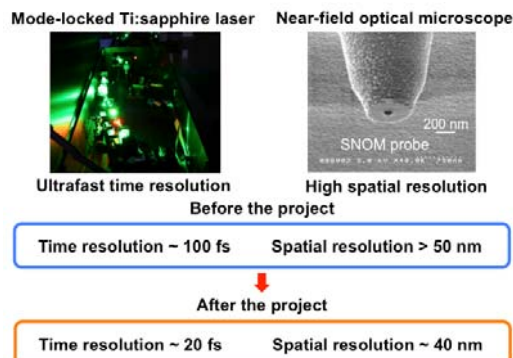


図 2. 本研究前後の超高時間分解近接場光学顕微鏡の性能の比較.

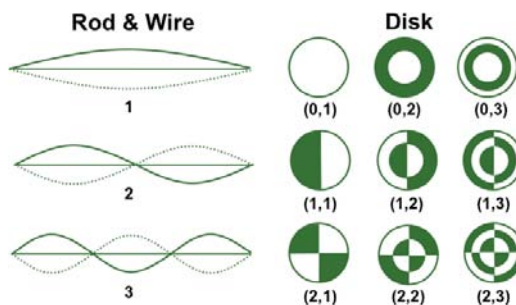


図 3. ワイヤおよびディスクに励起される共振モードの模式図.

った。可視化されるモードは、ワイヤに比べ複雑になり、すべてのモードの帰属には至っていない。しかし、可視化されるモードは、概ねドラム表面に励起される機械的共鳴モードと類似した特性を示すことが明らかとなった(図 3)。以上の研究から、ナノ構造体に励起されるプラズモン波動関数の空間形状とバルク固体に励起される機械的共振モードにアナロジーが成立することを明らかにした。

金属ナノ構造体以外に、金属膜にナノサイズの開口をもつ構造体についても研究対象とし、その近接場透過スペクトルマッピング測定を行った。ナノ開口内部に波動構造が観測され、その波動構造の観測波長依存性がワイヤに励起される波動関数と良い対応を示すことを明らかにした。

(3) プラズモニック物質の機能評価

プラズモニック物質の代表的な特異性の一つに光電場の増強がある。増強光電場は光ナノデバイスや高感度センサーの開発に利用されている。これらの応用においては、プラズモニック物質の機能の理解が不可欠である。そのためには、まずプラズモン増強場を正しく理解することが重要である。従来の研究から、金の二光子発光が光増強場のイメージングに有効であることは分かっていたが、プラズモニック物質に励起されるプラズモン共鳴と二光子発光スペクトルの関係は未解明であった。形状・サイズの異なる複数のナノロッドの近接場透過スペクトルと発光スペクトルを観測・解析した結果、プラズモン共鳴波長と発光スペクトル形状の相関を見いだした。また、それにより、二光子発光が、励起波長におけるプラズモン共鳴に加えて、発光波長に共鳴するプラズモン共鳴によっても増強されることを明らかにした。

従来の二光子発光の入射偏光依存性研究から、二光子の励起過程が段階的に起こることが示唆されていたが、それを実測した例はなかった。超高時間分解近接場光学顕微鏡を開発することで、短寿命種の励起状態寿命の評価が可能となった。二光子発光の時間相関測定から、二光子の励起過程が、フェムト秒の寿命をもつ一光子励起状態を経由することが明らかになった。観測された一光子励起状態の寿命は、数フェムト秒程度と短く、プラズモンの寿命を反映していることを明らかにした。以上の二光子発光の特長は、プラズモニック物質の機能評価において極めて有効であると考えられる。

プラズモニック物質の代表的な応用として、**プラズモニック光増強場を用いた近接分子からのラマン散乱の増強がある**。表面に凹凸の存在する金属薄膜試料を用いた研究から、表面の凸部において、光電場の増強が起こること、またそれがラマン活性部位と一致することを明らかにした(図 4)。さらに、二光子発光の時間相関幅測定から、光増強部位においてプラズモンの寿命が長いことを明きからにした。さらに、長寿命のプラズモンが励起される部分において、特にラマンが効率的に励起されることを明らかにした。これらの研究により、空間と時間の両方の側面からラマンの増強機構の検討を行うという新たな研究手法の有効性を示した。以上の結果は、プラズモンの寿命がプラ

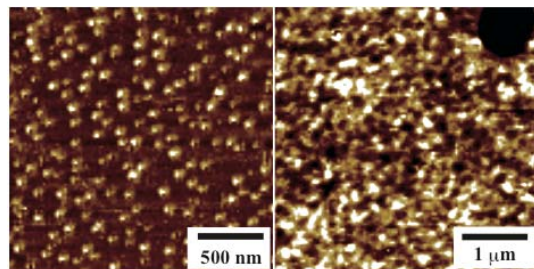


図 4. 凹凸金属薄膜の表面形態像(左)と近接場二光子励起像(右)。

ズモニック物質の機能評価において重要であることを直接示す成果である。

(4) プラズモニック光電場の光制御

プラズモニック物質の機能を制御するためには、複数のプラズモン共鳴をコヒーレントに励起する必要がある。その目的には、プラズモンの寿命に迫るパルス幅を実現する励起光源が必要である。短パルス光はスペクトル幅が広いので、これを複数のプラズモン共鳴を示すナノ構造体に照射すると、複数のプラズモンモードをコヒーレントに励起することができる。短パルス光源にパルス波形制御装置を組み合わせることで、励起光の時間特性またスペクトル特性を制御することができる。これにより、複数のプラズモンモードを励起するタイミングとその寄与を自在に制御することができる。プラズモンの機能評価には、(3)に述べたとおり二光子発光計測による光電場の可視化が有効である。

上記のような研究提案が確かに実現可能か確認するために、凹凸金属薄膜試料(図5)および金ナノワイヤを用いて、プラズモニック光電場空間構造の励起パルス波形依存性を測定した。これまでに励起パルスの波形制御により、励起される光電場の空間構造を変化させることに成功した。観測される光電場の空間構造の変化は多様である。すべてを統一的に理解するには至っていないが、概ね励起されるプラズモン波動関数の重ね合わせとして結果を説明することができる。以上の通り、励起パルスの波形制御により、波動関数を基礎とするプラズモニック物質の機能制御に世界にさきがけて成功した。

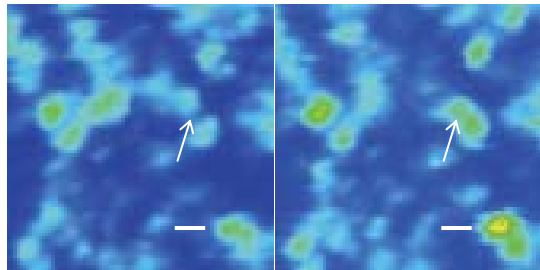


図5. 凹凸金薄膜の二光子励起像の励起光パルス波形による変化. 矢印の部分において大きな変化が認められる. スケールバー: 200 nm.

3. 今後の展開

本研究により、プラズモンの波動関数を基礎とするプラズモニック物質の機能制御にはじめて成功した。今後、これをさらに高度に、また成熟した技術に発展させるためには、プラズモンの寿命よりもさらに短い時間分解能を実現する必要がある。パルス光源と近接場光学顕微鏡の組み合わせでは、励起光の光ファイバーへの導入部、波形整形装置など、今なお改良が必要な部分があることが明らかとなっている。これらを改善することで、プラズモニック光電場を自在にデザインし、空間と時間の両軸でこれを制御することが可能となる。

本手法の有効性を確認する目的には、近接場光学顕微鏡の利用が不可欠であるが、その応用には顕微鏡の利用は必ずしも必要ではない。広い空間を光照射する場合においても、本研究手法を適用することができる。波動関数制御により、ナノメートルの空間分解能、位置精度で光電場を制御することができる。これを利用すれば、光場と分子の相互作用を高度に制御することが可能になり、光分子科学研究に新たな展開をもたらすことが期待される。また、応用面では、回折限界を超えるイメージング、位置センサーなどへの展開が期待される。

波動関数の制御技術は、プラズモンにとどまらず、エキシトンをはじめとする多様な素励起にも応用可能である。本研究手法は、光を利用する情報やエネルギーの伝播制御を可

能にする。今後、広範な分野への展開が期待される。

4、自己評価

本研究では、プラズモン波動関数の光制御法を確立し、それによりプラズモニック物質の特性を制御することを目指した。研究を効率的に推進するために、超高時間分解近接場光学顕微鏡の開発、プラズモン波動関数のイメージング、プラズモニック物質の機能評価の3つの項目を当面の研究課題とし、それらの研究成果を踏まえて、プラズモニック光電場の光制御に着手することとした。またナノ構造体については、共同研究者に試料作製を依頼し、これにより研究推進の効率化を図った。プラズモン波動関数のイメージングと機能評価の研究については、研究開始直後より相当の研究成果をあげることに成功した。一方、装置開発については、研究期間中に異動があり、性能向上に想定外の時間を要した。これにより、光制御研究の着手は大幅に遅れたが、最終的には、プラズモニック光電場の空間構造を制御することに成功し、当初の研究戦略の有用性自体は示すことができた。

プラズモニック物質の光特性、機能についての研究は、この数年の間に急激に進展した。しかし、それら従来の研究は、プラズモニック物質の受動的な性質に注目した研究である。本研究で実現したプラズモニック物質の波動関数制御は、将来プラズモンの機能を自在に制御することを可能にする。本研究成果により、プラズモン研究に新たな展開が期待される。今後の研究継続により、さらなる発展が可能であると考えている。

5、研究総括の見解

現在、プラズモン共鳴の研究は、基礎から応用にわたりきわめて広範囲に展開されているが、プラズモンの波動関数を計測制御しようとする試みは研究総括の知る限りない。井村研究者は超短パルスレーザーで回折限界以下の小さい領域を光励起できる近接場顕微鏡システムを開発し、それを駆使することで、プラズモニック物質の機能を照射光によりアクティブに制御する先例を示した。多方面から注目を集めているプラズモン共鳴の研究であるが、井村研究者は波動関数の計測にまで立ち戻ることにより新たな展開が可能になることを示した。この研究アプローチはさきがけ研究の正攻法とも考えられる。

6、主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. K. Imura, K. Ueno, H. Misawa, H. Okamoto, “Anomalous Light Transmission from Plasmonic Capped Nano-Apertures”, Nano Lett. 11, 960-965 (2011). |
| 2. S. I. Kim, K. Imura, S. Kim, H. Okamoto, “Confined Optical Fields in Nanovoid Chain Structures Directly Visualized by Near-Field Optical Imaging”, J. Phys. Chem. C 115, 1548-1555 (2011). |
| 3. K. Sawada, H. Nakamura, T. Maruoka, Y. Tamura, K. Imura, T. Saiki, H. Okamoto, “FDTD Simulated Observation of a Gold Nanorod by Scanning Near-Field Optical Microscopy”, Plasma Fusion Research 5, S2110 (2010) (4 pages). |
| 4. K. Imura, H. Okamoto, “Properties of Photoluminescence from Single Gold Nanorods |

Induced by Near-Field Two-Photon Excitation”、J. Phys. Chem. C 113、11756 (2009).

5. K. Imura、Y. C. Kim、S. Y. Kim、D. H. Jeong、H. Okamoto、“Two-photon Imaging of Localized Optical Fields in the Vicinity of Silver Nanowires Using a Scanning Near-field Optical Microscope”、Phys. Chem. Chem. Phys. 11、5876 (2009).

(2)特許出願

該当なし。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

その他の著作物

1. H. Okamoto、K. Imura、“Near-field imaging of optical field structures and plasmon wave functions in metal nanostructures”、Advances in Multi-Photon Processes and Spectroscopy、ed. S. H. Lin、A. A. Villaeys、Y. Fujimura、World Scientific 175-209 (2011).
2. K. Imura、H. Okamoto、“Near-Field Optical Imaging of Wave Functions and Optical Fields in Plasmonic Nanostructures”、Progress in Nanophotonics I、ed. M. Ohtsu、Springer-Verlag 127-140 (2011).

招待講演(国外、国内)

3. K. Imura、H. Okamoto、“Optical imaging of plasmon wavefunctions and optical fields in noble metal nanostructures”、Japan-Taiwan Symposium、Taiwan、March 2010.
4. K. Imura、H. Okamoto、“Visualization of plasmonic wavefunctions and optical fields using near-field optical microscope、” The 7th Asia-Pacific Conference on Near-Field Optics、Jeju、Korea、November 2009.
5. K. Imura、H. Okamoto、“Near-field optical imaging of plasmonic nanostructures”、Japan-Korea Joint Symposium、Hyogo、Japan、July 2009.
6. 井村考平、岡本裕巳、「プラズモニクナノ構造における波動関数の可視化とその制御」、第32回レーザ学会、宮城、2012年1月。
7. 井村考平、岡本裕巳、「近接場光学顕微鏡による動的プラズモンモードの可視化」、日本学術振興会第167ナノプローブテクノロジー委員会「光と電子の時空間極限ダイナミクス計測」、神奈川、2011年11月。
8. 井村考平、上野貢生、三澤弘明、岡本裕巳、「ナノ開口からの透過光増強」、超微細加工グループ連携ワークショップ、筑波、2011年10月。
9. 井村考平、岡本裕巳、「プラズモニクナノ構造における波動関数と光電場の可視化」、ナノフォトニクスオープンセミナー、静岡、2011年3月。
10. 井村考平、岡本裕巳、「時間分解近接場顕微鏡を用いたナノ構造の研究」、超高速時間分解光計測研究会、静岡、2011年3月。
11. 井村考平、「近接場ナノ分光手法によるプラズモンモードの可視化」、光科学異分野横断萌芽研究会、大阪、2011年2月。
12. 井村考平、「プラズモン光電場と分子の局所的相互作用」、シンポジウム「電子状態理論の新機軸」、愛知、2010年8月。
13. 井村考平、「ナノ構造体に励起されるプラズモン波動構造と異常光学特性」、分子研研究会「プラズモン増強光電場の分子科学研究への展開」、愛知、2010年6月。

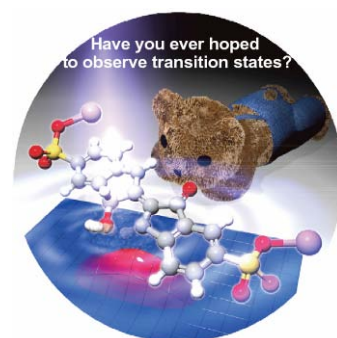
14. 井村考平、岡本裕巳、「近接場光学顕微鏡による局在プラズモンの研究」、応用物理学会シンポジウム「プラズモニクスと分子制御」、神奈川、2010年3月.
15. 井村考平、岡本裕巳、「プラズモニック物質のナノ分光研究」、理研シンポジウム／第1回日本分光学会ナノ分光部会シンポジウム「SPM を用いたナノ分光及びセンシング技術」、和光、2009年11月
16. 井村考平、「近接場分光法によるプラズモン波動関数の研究」、分子研研究会「プラズモニック物質と分子科学研究」、岡崎、2009年1月.
17. 井村考平、岡本裕巳、「近接場光学顕微鏡による局在プラズモンの研究」、日本顕微鏡学会 走査プローブ顕微鏡分科会 平成20年度研究会、金沢、2009年1月.
18. 井村考平、岡本裕巳、「貴金属ナノ構造体の近接場顕微分光研究」、分光学会高感度表面・界面分光部会第1回シンポジウム、筑波2008年12月.

研究報告書

研究課題名：「超高速分光による熱反応過程の直接観測と機構解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：岩倉 いずみ



1. 研究のねらい

遷移状態を“みたい”と思いませんか？

高速ストロボを用いた連続写真を低速再生するように、化学反応に伴い結合が解離したり生成したりする瞬間を“みる”ことは、化学者の夢であった。化学反応過程をみようとする“高速化学反応研究”の世界では、マイクロ秒(10^{-6} 秒)閃光パルスを用いたポンプ・プローブ測定研究が1949年に報告されてから、わずか40年あまりでフェムト秒(10^{-15} 秒)領域の高速計測にまで発展した。マイクロ秒領域の研究で1967年にPorterらが、フェムト秒領域の研究で1999年にZewailが、ノーベル賞を受賞した。その後、2002年には小林らが可視・極限的超短パルス光(5-fs パルス)を開発し、分子振動周期よりも十分に短いパルス光を用いることで、振動周波数の瞬時計測が可能になった。同時に、光反応に伴う分子構造変化も解析可能になったが、フェムト秒振動実時間光計測を熱反応過程の計測へ応用することは未開拓領域として残されていた。

熱反応過程の計測研究としては、既に、ピコ秒からマイクロ秒領域の時間分解分光測定が実現している。具体的には、「温度ジャンプ法」などを用いて、光エネルギーを熱エネルギーに変換することで、熱反応過程を計測している。しかしながら、熱反応過程の計測に振動実時間光計測法を応用するうえでは、数十～数百フェムト秒以内に光を用いて熱反応を誘起する必要がある。そこで、本研究においては、エネルギー変換を必要としない、極限的超短パルス光を用いる熱反応の直接誘起手法を開発し、熱反応過程を直接“みる”ことで反応機構を解明することを目的として、研究を行った。

2. 研究成果

極限的超短パルスを用いる熱反応の直接誘起手法

有機化合物の多くは紫外部に吸収を有しており、525–725 nm に広がった可視・極限的超短パルス光を照射しても電子状態の一光子励起は起こらない。そのため、誘導ラマン過程により電子基底状態において、分子振動が励起される可能性が高い。この可視光パルスは 5200 cm^{-1} のバンド幅を有しており、7500 K の熱励起と同程度の振動準位まで、ラマン活性である分子振動を励起することが可能である。励起された振動は熱励起程度の大きな振幅を有するが、その他の振動は室温中での振幅程度のままである。このような分子振動の直接的な励起や、数百フェムト秒での他の分子振動への移動等により、反応に関与する分子振動が励起される。その結果、光照射により電子状態が励起されることで誘起される光反応とは異なる、「電子基底状態における反応」が誘起されると期待できる。以下、その結果に関して、報告する。

(1) 熱クライゼン転位反応機構の解析〜アリルビニルエーテル

アリルアリールエーテルの[3,3]-シグマトロピー転位が、1912年にClaisenにより報告されて以来、様々な反応が開発されてきた。1938年にはアリルビニルエーテルを加熱するとアリルアセトアルデヒドが生成することが報告された。[3,3]-シグマトロピー転位はフロンティア軌道論とWoodward-Hoffmann則により、スプラスupra型6員環遷移状態を経由して進行すると考えられ、熱に対しては対称許容であるが、光に対しては対称禁制な反応である。この反応機構は、理論計算や反応速度論的同位体効果に基づき、反応が協奏的(Aromatic: 図2黄点線)に進行する機構、段階的に進行し、C-C結合が先に生成する機構(1,4-Diyl: 図2青点線)、C-O結合が先に開裂する機構(Bis-Allyl: 図2緑点線)、3種類の仮説が提唱されてきたが、詳細は不明であった。そこで、可視5-fsパルス光を用いてクライゼン転位反応に伴う分子振動の瞬時周波数を計測することで、転位に伴い変化する分子構造を直接観測し、反応機構を解明することを試みた。

反応開始直後、900 cm^{-1} に現れるエーテル部位のCOC対称伸縮振動($\nu_{\text{C-O-C}}$)と、1500 cm^{-1} に現れるメチレン部位の変角振動(δ_{CH_2})が800 fs後に消滅することから、C-O結合が開裂もしくは弱まったと考えられる。このC-O結合の変化は、炭素炭素二重結合伸縮振動($\nu_{\text{C=C}}$)の変化からも示唆され、励起直後には1650 cm^{-1} に現れる $\nu_{\text{C=C}}$ は、500~800 fs後にかけて、1690 cm^{-1} へ高波数シフトする成分と、1570 cm^{-1} へ低波数シフトする成分とに分かれる。これは、C-O結合長が伸びることにより、アリル部位からビニル部位に電子が流れ込み、ビニル部位では電子密度が高くなり $\nu_{\text{C=C}}$ が高波数シフトするのに対し、アリル部位では逆に電子密度が低くなり $\nu_{\text{C=C}}$ が低波数シフトするためである。次に1200~1500 fs後にかけて、ビニル部位からアリル部位に電子が流れ込み弱いC-C結合が生成することで、ビニル部位では電子密度が低くなり $\nu_{\text{C=C}}$ が低波数シフトするのに対しアリル部位では電子密度が高くなり $\nu_{\text{C=C}}$ が高波数シフトする。反応開始1500 fs後には、これらのC=C結合は等価になり、1580 cm^{-1} に新たなピークを与える。この1580 cm^{-1} のピークは、ベンゼンに代表される芳香属性を有するC=C結合の伸縮振動に相当することから、弱いC-C結合の生成に伴い、芳香族性を有する6員環構造を形成していることが示唆される。その後、C-O結合開裂とC-C結合生成が同時に進行することでアリルアセトアルデヒドが生成する(図1)。

以上、可視・極限的超短パルス光を用いてクライゼン転位反応過程を“みた”結果、従来の仮説とは異なり、3段階反応(図2赤線)を経由することが明らかになった。

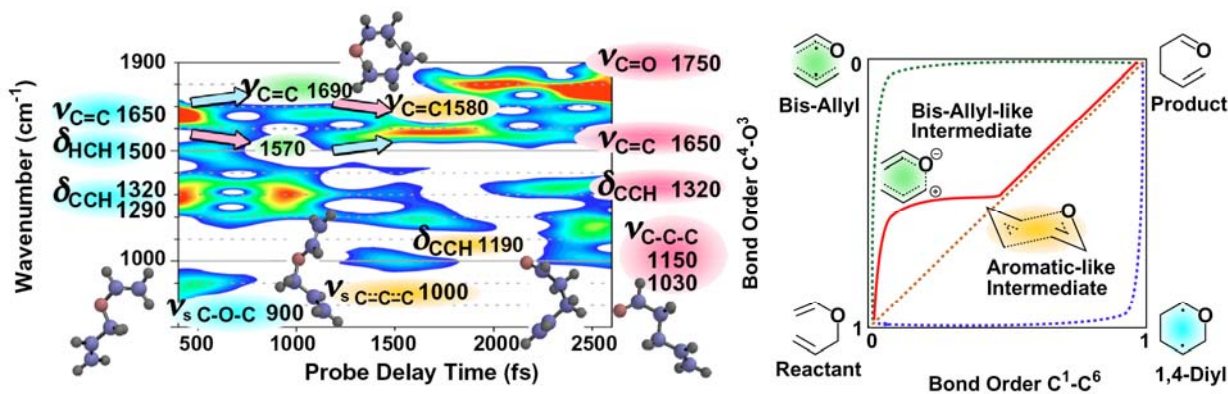


図1. 熱クライゼン転位過程(AVE)の直接観測 図2. クライゼン転位反応機構

(2) 光クライゼン転位反応と熱クライゼン転位反応の選択的な誘起

〜アリルフェニルエーテル

次に、光クライゼン転位（電子励起状態におけるラジカル反応）と熱クライゼン転位反応（電子基底状態における[3,3]-シグマトロピー転位）が報告されている、アリルフェニルエーテルに着目した。アリルフェニルエーテルに紫外光を照射すると、ラジカル活性種を經由して、フェノール、オルト置換フェノール、パラ置換フェノールが生成する。一方、加熱するとケト体の生成に続くケト-エノール互変異性により、オルト置換フェノールが生成する。そこで、紫外・極限的超短パルス光（360~440 nm）と可視・極限的超短パルス光（525~725 nm）を用いて、紫外部（400 nm 以下）に吸収を有するアリルフェニルエーテルの光クライゼン転位と熱クライゼン転位を選択的に誘起することを試みた（図3）。

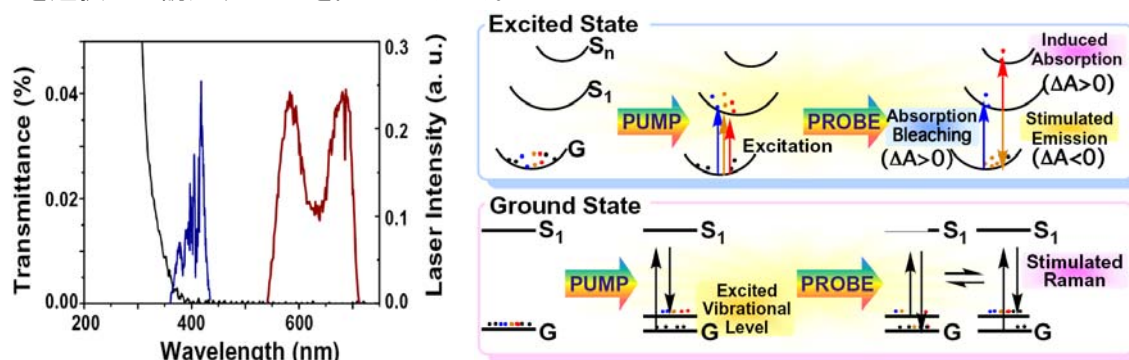


図3. レーザースペクトル 図4. ポンプ・プローブ測定の様式図

紫外パルスを用いた光計測結果を図5に示す。光照射直後に 1000 cm^{-1} に現れる、最も信号強度の強いフェニル部位の対称伸縮振動 (ν_{Ph}) は、フェノキシラジカル生成に伴い、 800 cm^{-1} に低波数シフトする成分と、 1000 cm^{-1} に保持される成分とに分かれる。また、 1080 cm^{-1} に現れるエーテル部位の C-O-C 対称伸縮振動 ($\nu_{\text{C-O-C}}$) は、C-O \cdot 基生成にともない徐々に高波数シフトし、 2000 fs 後には 1480 cm^{-1} に新たなピークを与える。一方、

1670 cm^{-1} に現れるアリル部位の炭素炭素二重結合伸縮振動 ($\nu_{\text{C=C}}$) は、アリルラジカルの生成にともない、 1500 fs 後には消滅し、あらたに 1510 cm^{-1} に C-C 伸縮振動が現れた。これらの結果は、紫外パルス照射後、約 $1.8\sim 2.0\text{ ps}$ でラジカル活性種が生成していることを示しており、極限的超短パルスを用いた場合にも、試料の電子遷移による吸収波長領域がレーザースペクトル領域と重なる場合には、従来通り、電子励起状態における光反応（光クライゼン転位）が進行することを確かめることができた。

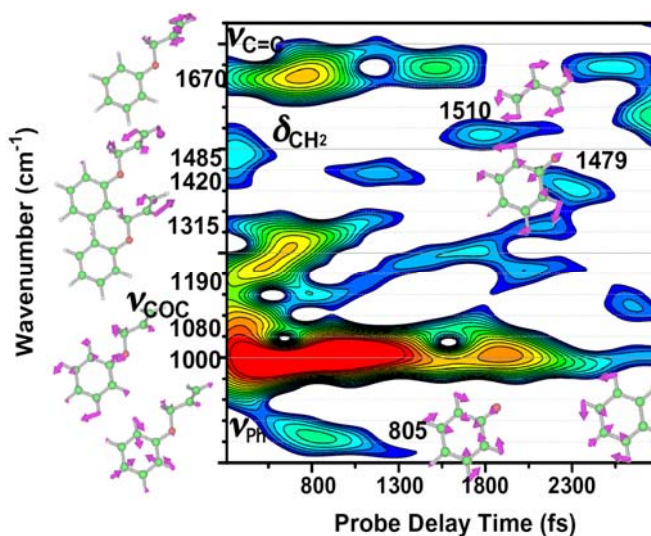


図5. 光クライゼン転位過程(APE)の直接観測

一方、可視光パルスを用いた光計測では、図6に示す結果が得られた。反応開始直後に計測されたアリルフェニルエーテルの分子振動のなかで、 1000 cm^{-1} に現れる ν_{spH} 、 1030 cm^{-1} に現れる $\nu_{\text{C-O-C}}$ 、 1230 cm^{-1} と 1420 cm^{-1} に現れる δ_{CH_2} が700 fs後に消滅することから、最初にC-O結合が弱まったと考えられる。次に500~750 fs後にかけて、励起直後には 1595 cm^{-1} に現れるベンゼン環の $\nu_{\text{C=C}}$ が 1500 cm^{-1} へ低波数シフトすることと、 1650 cm^{-1} に現れるアリル部位の $\nu_{\text{C=C}}$ が 1580 cm^{-1} へ低波数シフトすることから、芳香族性を有する6員環構造の形成が示唆される。さらに、励起1000 fs後に、 1750 cm^{-1} に $\nu_{\text{C=O}}$ に対応する新たなピークが現れることからケト体の生成が示される。生成したケト体は不安定であり、ケト-エノール互変異性によりオルトフェニルフェノールに変換されるため、2000 fs後には $\nu_{\text{C=O}}$ は消滅する。これらの結果は、電子基底状態における[3,3]-シグマトロピー転位反応が進行していることを示している。このように、電子状態を励起する最低遷移エネルギーよりも低い光子エネルギーの極限的超短パルス光を用いれば、誘導ラマン過程により分子振動を励起することで、「電子基底状態における反応」(熱クライゼン転位)を誘起できることが確認できた。

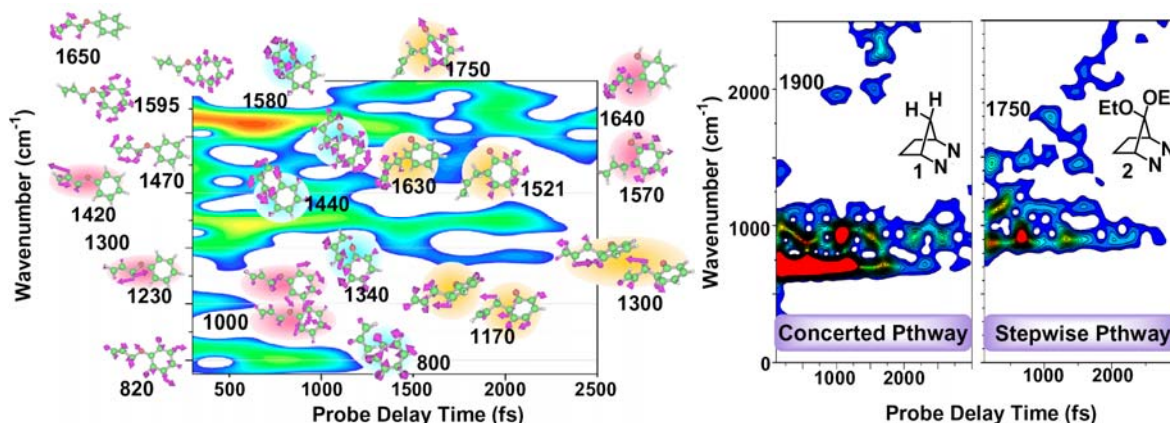


図6.熱クライゼン転位過程(APE)の直接観測

図7. 脱窒素反応過程の直接観測

(4) 脱窒素反応の機構解析

さらに、この手法を用いて、アゾアルカンの脱窒素反応過程の光計測を試みた。今回測定に用いた2,3-ジアザビシクロ[2.2.1]ペプテン(DBH)1およびC⁷位にOEt基を置換したDBH誘導体2はアゾ基由来の吸収帯(350 nm)より短波長側に吸収を有しており、可視光パルスを用いても紫外光パルスを用いても電子状態を励起することは不可能であるため、電子基底状態の反応が誘起できると考えた。その結果、可視光パルスと紫外光パルスのどちらを用いても、DBH1では反応開始1000 fs後に 1950 cm^{-1} にNN伸縮振動が、DBH誘導体2では反応開始1000 fs後に 1750 cm^{-1} にNN伸縮振動が現われた(図7)。これらの結果はDBH1では脱窒素反応が協奏的に進行するのに対し、DBH誘導体2では脱窒素反応が段階的に進行していることを示しており、C⁷位の置換基により反応機構が異なることが確認できた。また、電子状態を励起する最低遷移エネルギーよりも低い光子エネルギーの極限的超短パルス光を用いれば、用いる極限的超短パルス光の波長によらず、「電子基底状態における反応」を誘起できることが確認できた。

3. 今後の展開

以上、電子状態を励起する最低遷移エネルギーよりも低い光子エネルギーの極限的超短パルスを用いれば、誘導ラマン過程により分子振動を励起することで、**従来の光反応とは異なる「電子基底状態における反応」**が分子振動のコヒーレンスを保持して進行することを見いだした。この反応を誘起するためのキーポイントは以下の二つの条件であると考えている。

- 1) 分子振動周期よりも十分に短いパルス幅を有し、かつ、光電場の振動周期で数周期のパルス光である。
- 2) 電子状態を励起する最低遷移エネルギーよりも低い光子エネルギーのパルス光である。

通常の熱反応では、反応系内の全ての分子の分子振動が励起されるのに対し、本手法では、光子エネルギーを吸収した分子のみが振動励起される。また、誘導ラマン過程により、いくつかの分子振動モードのみが高い振動励起状態に励起され、その他の分子振動モードは室温での振動状態にとどまる。そのため、いくつかの分子のみが、ホット分子「高振動励起状態」になり、反応が進行していると考えられる。通常溶液中では、ホット分子が生成しても、周囲の溶媒分子との衝突でエネルギーを失うが、本反応では、周りの分子と衝突するよりもはるかに早く、数百 fs 程度でホット分子の化学反応が進行する。従来、超短パルス照射により、位相を揃えた状態で励起された分子振動は、分子内の他の振動モードにエネルギーを再分配することで緩和すると考えられてきた。しかし、緩和した振動は振動コヒーレンスを失うため、フェムト秒振動実時間光計測においては観測できない。少なくとも振動コヒーレンスを保持することで観測された反応は、分子内で分子振動エネルギーが再分配されるよりも速く進行していると推定される。

以上の理由から、今回、観測された反応は、熱反応と等価である可能性と、光反応とも熱反応とも異なる、“第3の反応”である可能性が考えられる。今後は、この極限的超短パルスを用いる振動励起により誘起される、“第3の反応”開発へとつなげていきたい。

4. 自己評価

熱反応には、大きくわけて、ラジカル反応、中和反応、吸核反応、吸電子反応、ペリ環状反応がある。本研究で計測したペリ環状反応は、反応性がフロンティア軌道論と Woodward-Hoffmann 則により説明できる。したがって、極限的超短パルス光を用いる振動励起により誘起される**「電子基底状態における反応」**は、熱反応と同じフロンティア軌道を有するために、同じ反応経路をたどっていると考えられる。そのため、ペリ環状反応においては、フェムト秒振動実時間光計測を熱反応過程の計測にも応用できる可能性を示すことができた。しかしながら、ラジカル反応、中和反応、吸核反応、吸電子反応においては、熱反応過程の計測に応用できておらず、これらの反応過程の計測は今後の課題であると考えている。また、上述したように、ラジカル反応、中和反応、吸核反応、吸電子反応においては、光反応とも熱反応とも異なる反応を誘起できる可能性が高く、“第3の反応”開発へとつなげていきたい。

5. 研究総括の見解

時間分解可視紫外吸収分光法により化学反応を実時間領域で直接測定し、そのダイナミクスを明らかにする研究は、物理化学の研究領域で過去数十年間極めて重要とみなされ、非常に多くの研究報告がなされてきた。この分光法では、超短パルスレーザーを励起光に用いることにより、時間分解能の向上が図られてきたものの、研究対象として熱的反応を調べた例は殆ど無く、とくに 10 fs オーダーの時間領域で分子の振動励起反応を研究した例はない。岩

倉研究者は化学者の直感、素直な思考にもとづき歴史的なモデル熱反応を取り上げ、持ち前のバイタリティーで、基底電子状態の分子振動励起による遷移状態のダイナミクスを直接測定することに成功した。結果は光反応、熱反応でもない、凝縮系の分子振動励起反応として理解され、さきがけ研究らしい展開となった。今後は、対象を広げ、この反応チャネルを一般的に実証し、新しいネーミングを付ける段階にまで進んで欲しいと考えている。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Izumi Iwakura, Atsushi Yabushita, Takayoshi Kobayashi, Direct Observation of the Molecular Structural Changes during the Claisen Rearrangement Including the Transition State, *Chemistry Letters*, **39**, 374-375 (2010). **Editor's Choice 選定論文**
2. Izumi Iwakura, The experimental visualization of molecular structural changes during both photochemical and thermal reactions by real-time vibrational spectroscopy, *Physical Chemistry and Chemical Physics*, **13**, 5546-5555 (2011).
3. Izumi Iwakura, Atsushi Yabushita, Takayoshi Kobayashi, Non-thermal reaction triggered by a stimulated Raman process using 5-fs laser pulses in the electronic ground state: Claisen rearrangement of allyl phenyl ether, *Chemical Physics Letters*, **501**, 567-571 (2011).
4. Izumi Iwakura, Atsushi Yabushita, Takayoshi Kobayashi, Transition State in a Prevented Proton-Transfer Observed in Real-Time, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **84**, 164-171 (2011). **Selected Paper**
5. Manabu Abe, Izumi Iwakura, Atsushi Yabushita, Shingo Yagi, Jun Liu, Kotaro Okamura, Takayoshi Kobayashi, Direct Observation of Denitrogenation Process of 2,3-Diazabicyclo[2.2.1]hept-2-ene (DBH) Derivatives, Using a Visible 5-fs pulse laser, *Chemical Physics Letters*, **527**, 79-83 (2012).

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

受賞

1. PCCP Prize 2010 for Outstanding Achievement of Young Scientists in Physical Chemistry and Chemical Physics (イギリス王立化学会), Direct Observation of Molecular Structural Change during the Chemical Reaction Including the Transition State, 2010年3月
2. 日本化学会第24回若い世代の特別講演会講演賞(日本化学会), 超短パルスを用いた分子振動の瞬時周波数変化測定による反応遷移状態の直接観測, 2010年3月
3. 日本化学会第89春季年会優秀講演賞, クライゼン転位反応の機構解明, 2009年3月

招待講演

1. 岩倉いずみ「遷移状態分光法による反応機構解析」第5回分子情報ダイナミクス研究会, 2010年3月
2. Izumi Iwakura “The visualization of the instantaneous molecular structure change during the chemical reaction including the transition state”, 12th Kyushu International Symposium on Physical Organic Chemistry, 2009年12月

研究報告書

研究課題名：「時空間波形制御技術の開発と微小空間領域での非線形分光計測への応用」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：太田 薫

1. 研究のねらい

分光法は光の性質（振幅や位相、偏光）を利用し、周波数軸に分散したスペクトルを測定することで、物質材料や生命組織の微視的構造やダイナミクスを調べることができる重要な計測手法の一つである。微小空間領域での局所的な構造ダイナミクスの追跡や化学反応などの制御には時間分解能だけではなく、空間分解能も重要である。しかし、パルス光の時間、空間領域の両方の性質を極限にまで生かす波形制御技術やそれを利用した非線形分光法は未開拓のままである。本研究では超短パルス光の振幅や位相を時間、空間領域で同時に波形制御する新規かつ革新的手法の開発を行う。このことにより、時間領域で波形制御した超短パルス光の空間的なビームプロファイルを自由自在に制御することができる。さらに、我々が得意とする非線形分光法と融合することにより、微小空間領域での分光計測への可能性を追求する(図1)。

超短パルス光の波形制御技術はこれまで、時間領域で任意のプロファイルを持つ光を生成することを目的として発展し、化学反応や緩和過程のコヒーレント制御などの研究に応用されてきた。このような実験では、対象とする試料は透明で散乱が少なく、パルス光の時間的な性質が大きく変わらないことが前提条件であった。一方、パルス光の空間領域での波形制御技術は光の波面を正確に制御、補償することを目的として発展し、顕微分光でのイメージのコントラストの向上などに応用されている。しかし、このような手法を用いても、生体組織といった不透明試料の深部を高分解能で観測するには不十分であった。

本研究では、波面の空間的な歪みの補正とパルス光の時間特性の最適化を同時に行うといった手法の確立だけではなく、光が直進しないような散乱体中で、ある特定の場所に光を時間的、空間的に局在化させるといった課題にも挑戦する。超短パルス光の性質を時空間で積極的に操ることができれば、パルス光の特性が大きく変化し、これまでの分光手法が全く使えない状況に

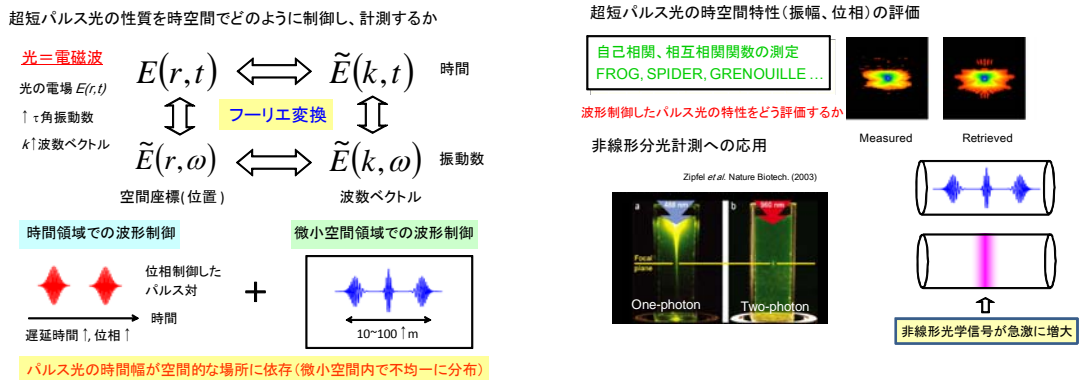


図1 研究計画の概要

においても、様々な現象を観察できる可能性が広がる。本研究では、新たに装置構築、開発から行い、異分野からのアイデアを積極的に取り入れることにより、初めて、実現が可能となるような方法論の開発に重点を置いている。

2. 研究成果

波長可変超短パルス光源システムの構築

研究を遂行するための光源として、フェムト秒チタンサファイアレーザーを導入し、非同軸光パラメトリック増幅器(NOPA)の構築を行った(図 2)。高出力かつパルス光の上質な空間モードを得るため、白色光シードで2個のBBO結晶を用いた2段増幅による光学配置を用いた。その結果、500-700 nmで10 μJ以上の可視光を安定に発生させることができた。得られたパルス光のスペクトルを計測し、スペクトル幅 40-50 nmであることがわかった。出力パルス光の時間特性を評価したところ、その時間幅が15-18 fs程度であった。さらに、超短パルス光の時空間制御の可能性とその限界を調べるため、NOPAの改良を行い、スペクトル幅を100 nm以上に広げることができた。このような超短パルス光では、図1のフーリエ変換の関係から明らかのように、時空間特性の相関が重要となる。そのため、両者が絡んだ波形制御が必要となり、本手法の特色を最大限に活かすことができる。

広帯域光パラメトリック増幅器の概要

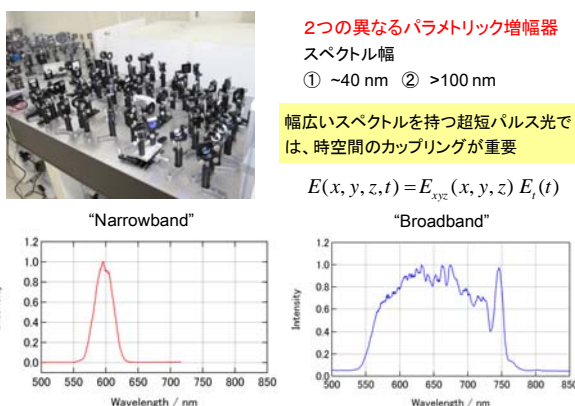


図 2 本研究で構築した波長可変超短パルス光源と光源から発生させたパルス光のスペクトル

時間領域での波形制御装置の構築と波形制御装置を用いた超短パルス光の時間特性の評価

1次元液晶空間変調器を用いた時間領域での波形制御装置を立ち上げた。レンズなどの色収差による影響を避けるため、円筒ミラーを用いた反射光学系をベースとした波形制御装置を構築した。周波数分解光ゲート法(FROG)や波形制御装置を用いた多光子パルス列干渉法(MIIPS)の計測系を構築し、パルス光の特性評価を行った。FROG法やMIIPS法により、光パラメトリック増幅器で発生させたパルス光の振幅と位相を同時に決定することができた。特に、MIIPS法では波形制御装置により、パルス光の振幅、位相の制御と計測を同時に行うことが可能となる(図3)。波形制御装置では、パルス光の最適化だけでなく、任意のパルス列を生成させることができるので、長時間の位相安定性を維持

波形制御装置を用いた超短パルス光の時間特性の評価

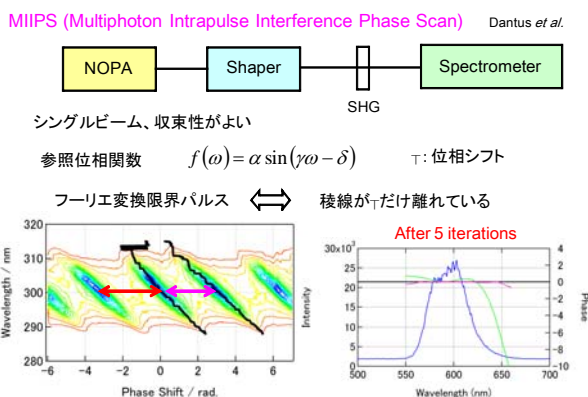


図 3 MIIPS 法による超短パルス光の特性評価とその計測例

した状態で、非線形光学信号の計測が可能となる。

空間領域での波形制御装置の構築とレーザー光の波面歪みの補償と制御

2次元液晶空間変調器を用いた空間領域での波形制御装置の構築を行った。また、空間的なビームの特性を評価するため、CCD カメラを用いた画像計測系の立ち上げも行った。ここでは、当初予定していたシャックハルトマン波面センサーによる計測ではなく、2次元液晶空間変調器を用いた波面計測系を構築した。この計測系により、試料位置での波面歪みの計測と補償、制御を同時に行うことが可能となった(図4)。非線形光学効果を利用した分光法と組み合わせることにより、時空間分光計測の分解能や信号雑音比の大幅な向上が期待できる。

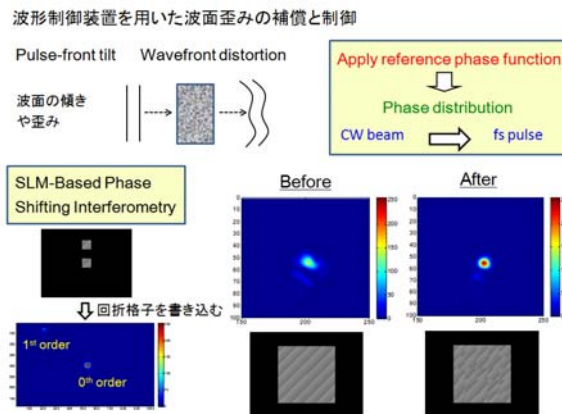


図4 波形制御装置を用いた波面歪みの制御：ここでは、空間変調器の画面を25区画に分け、2区画に回折格子を書き込む。1次の回折光の干渉を観測し、その位相差を決定する。各区画の位相を最適化することにより、波面の歪みが補正することができる。

散乱体透過条件下でのレーザー光の時空間制御

光学的に均一な場合と異なり、散乱体透過、反射条件下では超短パルス光の時空間特性は大きく変化し、その波面はスペckル状(斑点の集まり)になる。このため、高い時間、空間分解能での分光計測が不可能となる。このような状況においても、パルス光をある一点に集光し、時空間特性を最適化することができれば、これまでの分光手法が適応困難な状況においても様々な現象が観測でき、計測や制御の守備範囲が飛躍的に広がることを予想される。ここでは、2次元液晶空間変調器の位相をランダムに変化させ、多変数の効率的な最適化を行うことにより、ある特定の場所に光を局在化させることができた(図5)。さらに、散乱体での光伝搬の時間反転対称性を利用した伝送行列(Transmission matrix)法による時空間制御法による実験を行い、レーザー光を任意の異なる場所に短時間で局在化させることに成功した(図6)。今後は、時空間特性が絡みあう状況での波形制御法の方法論の確立と分光、イメージ計測の手法の開発を行っていきたい。

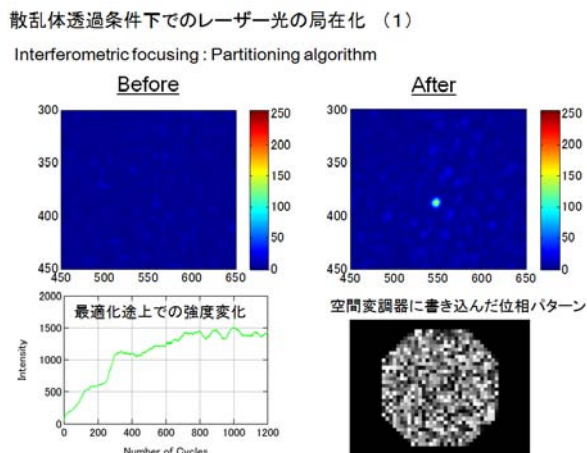


図5 散乱体透過条件下でのレーザー光での局在化：図右下のように、空間変調器の画面を880区画に分け、位相をランダムに変化することにより、特定の場所での強度が最大となるように、各区画の位相を最適化する。

散乱体透過条件下でのレーザー光の局在化 (2)

Measurement of transmission matrix 行列サイズ 1024 × 1024

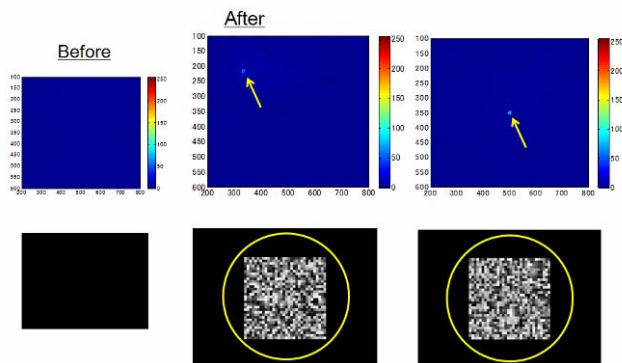


図 6 散乱体透過条件下でのレーザー光での局在化 : 図下のように、空間変調器の画面を 1024 区画に分け、各要素が 0 と π で構成されるアダマール基底行列を書き込む。その際の散乱画像を計測することにより、伝送行列を計算する。伝送行列の逆行列を求めることにより、特定の場所にレーザー光を局在化させることができる。

3. 今後の展開

近年、超短パルス光の利用はその特徴的な性質を生かし、基礎科学の分野だけではなく、ライフサイエンス分野での非線形光学効果を利用したイメージング分光法へと急速にその対象を広げている。そのため、細胞組織を取り出すことなく、生体内で非破壊的に観測できる手法の開発が多方面から望まれている。特に多光子顕微鏡によるイメージ計測では、励起に近赤外領域のパルス光を用いるため、散乱の影響が小さくなり、不透明試料の深部を観測できることといった利点を有している。しかし、深さ方向の分解能は依然として、ミリメートルオーダーで、表面近傍での状態が明瞭に観測されるのみであった。

今後は、本研究で開拓してきた方法論と非線形分光計測を融合し、従来では測定不可能であった対象への応用や展開を追求していきたい。現状では、波面の歪みは素早く補正することができるが、散乱体透過条件下での光の局在化には 30 分から 1 時間程度の計測時間が必要である。そのため、計測中に散乱条件が変化しないことが前提である。生体組織への展開を考えた場合、高速で波形制御を行う必要がある。また、散乱体透過条件下で光をある 1 点に集中させるだけではなく、画像を短時間で計測することができれば、レーザー光や試料部を走査せずにイメージングを行うことが可能となる。本研究で展開してきた方法論はまだ発展途上であるものの、超短パルス光の伝搬制御といった基礎的な光学の問題だけではなく、光源の先端的な利用と制御技術、計測法が融合することによって、バイオや医療といった様々な分野での応用展開が期待できる。

4. 自己評価

本研究では、時空間領域での超短パルス光の波形制御技術の開発と微小空間領域での線形分光計測への応用という目的で研究を開始した。当初の計画では、計算機プログラムを利用した光ビームパターンを微小空間に投影し、時間領域での波形制御と組み合わせて、非線形分光計測を行う予定であった。研究で用いる波長可変超短パルス光源や時間領域での波形制御装置を自作したため、研究期間の前半、立ち上げにかなりの時間を要した。最近、類似の手法を光遺伝学への応用した例などが報告され、その有用性が示されている。しかし、空間分解能は

回折限界で決まるため、“光の利用“という観点での手法の斬新性はないと考えた。そこで、時空間領域で複雑に絡みあった超短パルス光の特性をどのように評価し、制御するかという課題に方向転換した。この場合、時間領域と空間領域の波形制御を単純に組み合わせれば、実現できるというわけではなく、光が複雑な様相を示す媒質中をどのように伝搬するかを正面からとらえ、それを制御に活かすかという多くの基礎的な問題を含んでいる。このため、これまでの分光手法が全く使えない状況においても波形制御法と組み合わせることで実現できるという可能性が拡がり、様々な分野への応用が期待できる。方向転換後、超短パルス光の波面の歪みを計測、制御し、その時空間特性を最適化することが目標であったが、より複雑な散乱体透過条件下での超短パルス光の局在化というテーマにも挑戦することができ、一定の道筋がつけられたのは大きな成果であった。これは当初の計画では予定しておらず、全く別の可能性や方向性を示めすことができたと考えている。今後は、方法論の開拓を含め、非線形分光計測や制御への展開に力を注いでいきたい。本研究では、新たに実験装置を立ち上げ、異分野からのアイデアを積極的に取り入れて、課題の解決に挑んでいくというものであった。これまでとは全く異なる方法論や考え方を一から勉強せねばならず、順調に進んだとはいえないが、さきがけ研究でなければ挑戦できなかった課題に取り組み、超短パルス光の利用に対する新たな方向性を見出すことができたと考えている。

5. 研究総括の見解

パルス波形を制御することにより光化学反応の収率を向上させる研究、高次の非線形分光により超精密に励起状態分子の構造ダイナミクスを調べる研究を超えて、動的計測と分光を融合した微小領域の分光計測技術を開拓することを目指した。基礎的な課題で、広い知識、高度な技術が要求され、数々の実験的難題に出くわしたが、最終的には時間領域と空間領域で波面各部の位相制御を実現することにより、複雑な散乱体透過条件下での超短パルスの局在化を図る技術開発に一つの突破口を見出した。それを可能にしたのは、論文化をむやみに求めずに次の科学技術の種を探索することをよしとする、さきがけ研究の枠組みであり、太田研究者が発想をうまく転換したところに研究展開の秘密がある。まだ道半ばであるが、今後の大いなる発展に期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表

Kaoru Ohta

“Development of spatio-temporal pulse-shaping technique and its application to nonlinear optical spectroscopy in microscopic region”

Academia Sinica & JST Joint Workshop on “INNOVATIVE USE OF LIGHT AND NANO/BIO MATERIALS”, Taipei, Taiwan, May 26-27, 2011

依頼講演

太田 薫

「非線形分光法による凝縮系でのダイナミクスの研究と超短パルス光の波形制御、計測法への展開」

強光子場科学研究懇談会講演会 神戸大学、平成 23 年 6 月 24 日

研究報告書

研究課題名：「不凍タンパク質作用発現機構の解明を目指したその場光観察」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：佐崎 元

1. 研究のねらい

寒冷地の動植物を凍結から護る不凍タンパク質は、食品の低温保存や冷凍食品の品質保全、低温医療などへの応用が期待されているが、その作用機構は未だ想像の域を出ていない。作用機構を直接解明するための「研究手段」がこれまでなかったことが、その理由である。不凍タンパク質の作用機構を明らかにするには、「不凍タンパク質分子」が氷結晶表面でどのように拡散・吸着・脱離するのか(図1)、そしてその結果、氷結晶の成長の大本となる「単位ステップ」(結晶を形作る分子層の成長端)の運動に不凍タンパク質がどのように影響を及ぼすのか(図1)、この両者を直接観察するための手段を新たに開発するしかないと着想した。これを実現するべく、さきがけ研究では、次に挙げる3つの直接観察を達成するための光学顕微技術の開発に挑んだ。

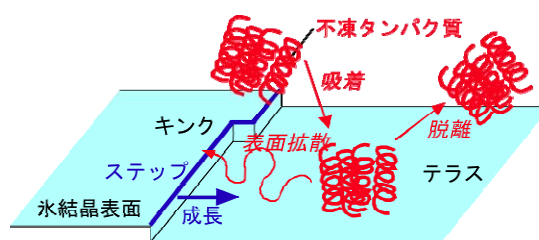


図1 氷結晶表面での不凍タンパク質の挙動と、それに対する氷結晶の分子層(その成長端をステップと呼ぶ)の応答。

- 1) 気相(過飽和水蒸気)から成長する氷結晶表面での単位ステップの観察。空気-氷界面の反射率は1.8%と比較的大きいため、この観察が出来なければ、2)の観察も不可能となる。
- 2) 融液相(過冷却水)から成長する氷結晶表面での単位ステップの観察。水-氷界面の反射率は0.007%と極めて小さい。成功すれば、融液-結晶界面の初めての分子レベル観察となる。
- 3) 水-氷界面での不凍タンパク質の蛍光1分子観察。氷結晶周囲での蛍光輝度分布の測定など、マクロな計測はこれまでもあるが、分子レベルでの観察は未だ全くない。

2. 研究成果

1) 気相から成長する氷結晶表面(空気-氷界面:反射率1.8%)での単位ステップの観察

これまでに光学顕微鏡メーカーと共に開発してきたレーザー共焦点微分干渉顕微鏡の、縦方向感度を飛躍的に改善するために、顕微鏡中の各光学素子の偏光特性を向上させるとともに、偏光面の角度を微調整する機構を作製・追加した。そして、過飽和水蒸気中で成長させた氷結晶(雪結晶と同じ)の表面を、この光学顕微鏡を用いて観察した。

その結果、氷結晶の六角底面上で、2次元島状の分子層が多数出現し、それらが横方向に成長し広がることで結晶が成長する様子が観察出来た(図2)。隣り合った分子層が合体する際にその縁(ステップ)のコントラストが完全に消滅することは(図2中の+印)、隣り合った分子層の厚みが等しいことを示す。分子層の合体に伴うステップコントラストの消滅が結晶表面上のいたるところで常に観察されることより、可視化した分子層は、結晶構造より決まる最小の厚みを持った単位ステップ(0.37 nm 厚み)であることを証明した。また、氷結晶の側面上でも同様に単位ステップが観察できた。さらに、結晶が渦巻成長する様子の観察にも成功した。本

研究により、氷結晶が成長する様子を初めて分子レベルで追跡することが可能になった (PNAS, 2010)。

本研究では、氷結晶の大本となる基本構造(単位ステップ)をその成長中に直接可視化することに初めて成功した。この光学顕微鏡技術を用いると、氷結晶の成長・融解・昇華などの相転移機構を分子レベルで明らかにできるのみでなく、エアロゾルやオゾンホールなどの環境破壊、不凍タンパク質による動植物の凍結防止、さらには地球温暖化などの機構解明に役立つと期待される。

さらに、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡を用いて、氷結晶の表面融解過程を直接観察した。その結果、氷結晶の六角底面上で、あたかも水と油の様に互いに混じり合わない2種類の表面液体相(疑似液体層)が生成することを発見した(図3)(PNAS, 2012)。 -1.5°C より低い温度では氷結晶の表面は成長するのみであるが、 $-1.5\sim-0.4^{\circ}\text{C}$ よりも高い温度ではバルク状の液滴(α 相:図3の白三角)が、

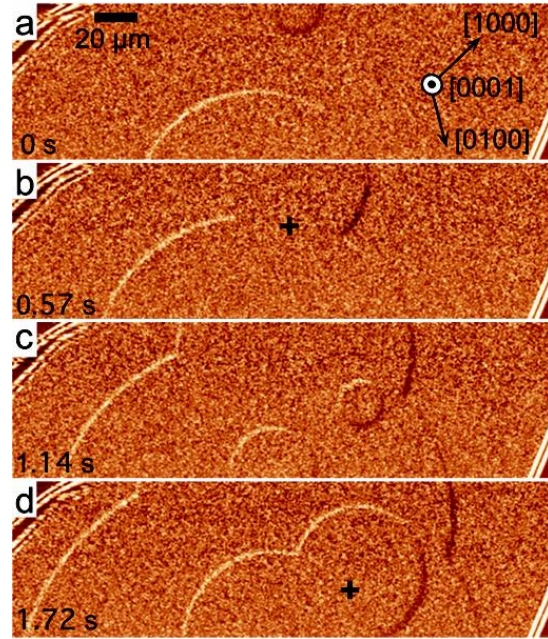


図2 氷結晶の六角底面上で、2次元島状の分子層(0.37 nm厚み)が多数出現し、それらが横方向に広がることで結晶が成長する様子。画像は0.57秒ごとに撮影した。隣り合った分子層が合体すると、互いの厚みが等しいため、分子層の縁(ステップ)のコントラストが完全に消滅する(図中+印)ことがわかる。

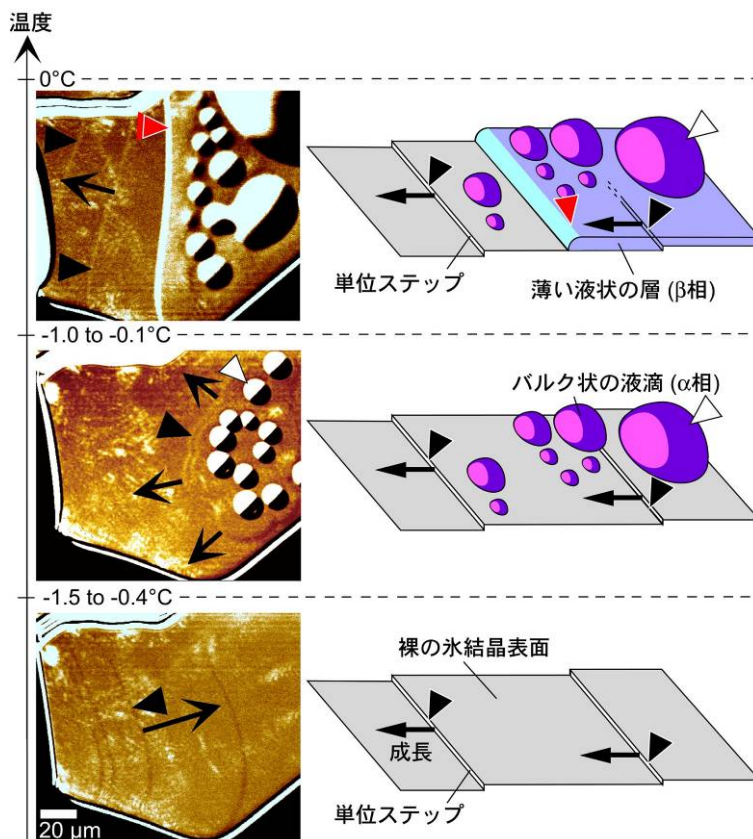


図3 氷結晶の六角底面上で生成する2種類の表面液体相。図の左側は光学顕微鏡写真で、右側は模式図。 α 相(白三角)と β 相(赤三角)の発生温度は実験のたびに若干のずれを示したが、同じ実験中では常に β 相は α 相よりも高温で発生した。2種類の表面液体相は、ダイナミックに氷結晶表面上を動き回り、合体を繰り返した。黒三角は氷結晶表面上の水1分子高さの分子層(単位ステップ)を示す。

そして $-1.0\sim-0.1^{\circ}\text{C}$ よりも高い温度では薄い液状の層(β 相: 図3の赤三角)が生成した。これらの形状の違いは、2つの表面液体相の物理的・化学的性質が大きく異なることを示す。2種類の表面液体相は、氷の結晶表面上を動き回り、合体を繰り返した。これまでは、表面液体相は1種類しか存在せず、氷の全表面から一様に生成すると考えられてきた。しかし、本研究により、2種類の表面液体相が存在し、それらは氷の表面上で極めて不均一かつダイナミックな振る舞いをするということがわかった。

水と油は性質が全く異なる分子より出来ているため互いに混ざり合わない。しかし、同じ水分子から出来ている2種類の表面液体相が互いに混ざり合わず、あたかも水面上に雨粒が乗った様な振る舞いを示すことは(図3)、基礎科学の観点から極めて興味深い。

本研究では、性質が異なる2種類の表面液体相が存在し、これらが氷の表面上で不均一かつダイナミックに振る舞うことを見出すことに成功した。本研究により得られた表面液体相についての新たな描像は、スケートの滑りやすさから雷雲での電気の発生まで、表面液体相が重要な役割を果たす幅広い現象の秘密を解き明かす鍵を握ると期待される。

2) 融液相から成長する氷結晶表面(水-氷界面: 反射率 0.007%)での単位ステップの観察

氷とその融液である水の屈折率差は非常に小さいため、水-氷界面の反射率はわずか0.007%しかない。このようなほぼ透明な界面においても単位ステップを観察するべく、1)で用いたものよりも5倍高出力なスーパーレミネッセントダイオード(波長 790 nm, 50 mW)を光源として用いた。それに伴い、光源の波長が赤外線領域に近くなったため、赤外線に対してより透過光強度の大きな素子を用いて光学系を作製し直した。また、融液からの結晶の成長は、気相からの成長に比べて何桁も速いため、分子レベルでの界面観察を行うには、氷結晶の成長を何とかして止める必要がある。そのため、上部を冷却して下部を加熱する温度勾配型の観察チャンバーを新たに作製し、観察を行った。

純水中で成長する氷結晶表面の一例を図4に示す。渦巻成長ステップ(黒矢印)とその前進を明瞭に捉えることができた。融液と結晶の界面での分子レベル直接観察には、材料によらずこれまでまだ誰も成功しておらず、本研究が初めての成功例となる。このステップが「単位ステップ」であるかどうかはまだ確認できていないが、今後様々な条件下で成長実験を繰り返し、氷結晶が2次元核成長する様子を捉えることで証明できると期待している。

また、0.01 mg/mL の濃度で不凍タンパク質を加えると、不凍タンパク質が氷結晶表面でステップの前進を妨げるために、ステップが顕著に束化(バンチング)すること、およびステップの発生と成長に振動が見られることを見出している。

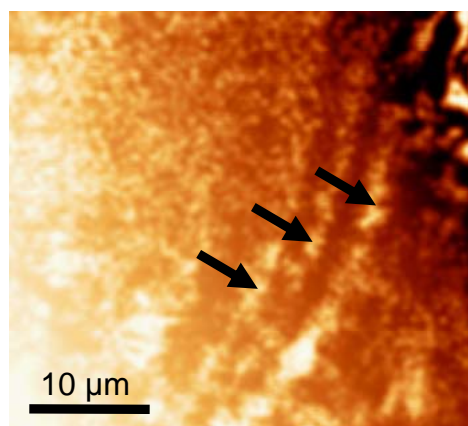


図4 純水中で観察した氷結晶の底面。黒矢印はステップを示す。

3) 水-氷界面での不凍タンパク質の蛍光1分子観察

まず、不凍タンパク質(タイプ III: ナガガジ科魚由来)に、蛍光ラベル化色素(NHS-Rhodamine)を化学修飾し、蛍光ラベル化によってタンパク質の不凍活性が失われていないことを実験的に

確認した。また、2)で作製した観察チャンバーの上部にダブリズムを設置し、ダブリズムの斜め上方より蛍光励起用レーザー(532 nm、最大 100 mW)を照射するための光学系を作製した。そして、ダブリズムとカバーガラス間に蛍光ラベル化不凍タンパク質溶液をはさみ、蛍光ラベル化した個々の不凍タンパク質分子がダブリズムによって1分子観察できることを確認した。

ダブリズムに貼付けた AgI 種結晶上で、氷結晶を蛍光ラベル化不凍タンパク質溶液から成長させた。成長が停止した水溶液-氷結晶界面の形状像(光干渉像)と、同一視野の蛍光像を直接観察することに初めて成功した(図5)。干渉縞は等高線に対応する。図より、氷結晶表面がところどころ凹状にへこんでいること、およびへこんだ底には必ず蛍光ラベル化不凍タンパク質が吸着していることが分かる。氷結晶表面に蛍光ラベル化不凍タンパク質が吸着した結果、ギブストムソン効果により氷結晶の成長が停止したものと考えられる。氷結晶表面の形状像と蛍光像を同時観察することで、従来考えられて来た予想の一つが正しいことを示す初めての実験的証拠を得ることに成功した。図5では、氷結晶表面の凹凸が激しすぎたために、氷結晶表面のステップを直接観察するにはいたらなかったが、今後同様の観察を、条件を様々に変えて行うことで、不凍タンパク質の作用発現機構を明らかにすることが出来ると期待される。

研究開始当初に目標とした、蛍光ラベル化不凍タンパク質の氷結晶表面上での1分子観察はまだ達成出来ておらず、蛍光ラベル化不凍タンパク質が集まり吸着した領域(図5模式図)を観察するにとどまっている。しかし、まだ対策はあり、今後進めてゆきたい(4. 今後の展開を参照)。

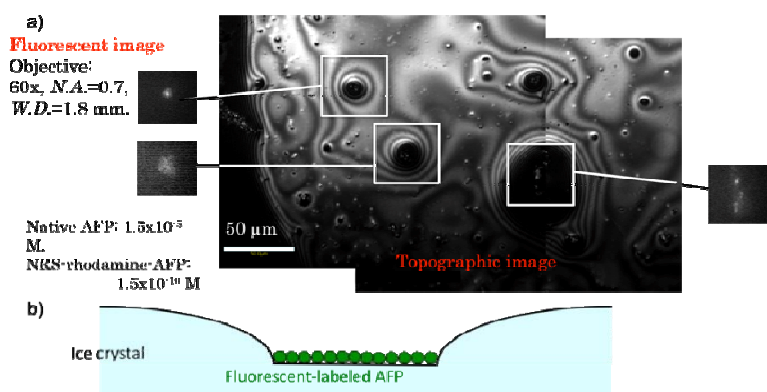


図5 蛍光ラベル化不凍タンパク質 0.01mg/mL存在下で成長が停止した氷結晶表面(a)と断面の模式図(b)。(a)の中央は反射の光干渉像(干渉縞は等高線を示す)。白四角中を蛍光観察した結果も同時に(a)に示した。蛍光像中の白色のコントラストは、氷結晶に吸着した蛍光ラベル化不凍タンパク質を示す。

3. 今後の展開

さきがけ研究により、不凍タンパク質の作用発現機構をこれから明らかにするために必要な全く新しい観察手段を開発することに成功した。すなわち、図6に示すように、従来は氷の結晶面の縦方向への平均の成長を観察するのみであったが、本研究によって結晶面内の個々の単位ステップの横方向への成長を観察できるようになった。また、これまで結晶の表面や周囲での不凍タンパク質の濃度分布を観察するのみであったが、本研究によって氷結晶面内の吸着部位の分布等を観察できるようになった。今後、本さきがけ研究で得られた強力な観察手段を用いて、様々な条件下でステップと不凍タンパク質の相互作用を直接観察することで、不凍タンパク質の作用発現機構を明らかにする研究に取り組んでゆきたい。

ただ、氷結晶表面上での個々の不凍タンパク質の蛍光1分子観察は、まだ達成できていない。現在、ドライ型では開口数が最大(0.7)の対物レンズ(60x、作動距離 1.8 mm)を用いているが、蛍光強度がまだ不足していること、および水溶液中を観察するために発生する収差が

その原因であることがわかった。蛍光1分子観察に通常用いられる油浸型対物レンズ(開口数 1.45、60x)では、作動距離が 0.1 mm 程度と小さすぎるため、観察系を構築できない。しかし最近、開口数と作動距離の両者が必要条件を満たす対物レンズ(水浸型、開口数 1.05、作動距離 2.0 mm、25x)が開発された(2光子励起用で約 200 万円:通常型よりも瞳径が大きく、顕微鏡の改造も必要)。この対物レンズにさらにカバーガラスによる収差を補正する改造(200-300 万円)を加えることで、蛍光1分子観察を必ず達成できるものと予想している。他の予算(500-600 万円)を獲得し、近い将来に再度挑戦したい。

4. 自己評価

さきがけ研究の開始当初に設けた3つの技術的課題のうち、はじめの2つ(気相および融液相から成長する氷結晶表面でのステップの直接観察)は完全に成功した。また、この技術を用いて表面融解現象を初めて分子レベルで可視化することにも成功し、2種類の表面液体相が存在することを発見した。表面液体相の発見は、研究開始当初には全く予想していなかった大きな副産物であり、プラスに評価できる。しかし3つめの技術的課題については、水-氷界面での蛍光観察には成功し、不凍タンパク質が氷結晶の成長を抑制する機構について重要な知見を得たが、個々の分子を1分子観察するには至らなかった。この点については、技術的な改善の余地がまだ十分にあると予想しており、今後取り組みたい(4. 今後の展開を参照)。以上、予想外のプラス点とマイナス点の両方を勘案すると、達成率は 80%程度であると自己評価している。

5. 研究総括の見解

レーザー共焦点微分干渉顕微鏡の深さ方向の感度を飛躍的に高め、単一ステップの精度で気相から成長する氷結晶表面を直接観察し、また氷結晶の表面融解過程の可視化にも成功した。当初の目的である不凍タンパク質の作用発現機構については、氷結晶の成長阻害は不凍タンパク質が氷表面に吸着した場所で起こることを観察している。氷、不凍化現象、タンパク質と氷にもすぐに受け入れられる言葉や現象であるが、科学的には再現性も容易ではない複雑現象をサブナノレベルで解析してみせたことは、光技術の高いポテンシャルを示す好例と言える。近い将来、不凍タンパク質の作用機構に迫る研究がなされ、佐崎研究者の先進的研究が世界で認められるよう願っている。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama, Y. Furukawa, "Elementary steps at the surface of ice crystals visualized by advanced optical microscopy", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **107**, 19702-19707 (2010). (Selected as **In This Issue PNAS**)
2. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, M. Yokomine, Y. Furukawa, "Quasi-liquid layers on ice crystal surfaces are made up of two different phases", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **109**, 1052-1055 (2012). (Selected as **In This Issue PNAS**)
3. 佐崎 元, サルバドール ゼペダ, 中坪俊一, 古川義純, "レーザー共焦点微分干渉顕微

鏡を用いた氷結晶表面での分子ステップのその場観察”, 光学, 41, 33-35 (2012).

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(受賞1件、国際会議での招待講演件9件、国内会議での招待講演5件、国際会議での一般発表5件、国内会議での一般発表8件、JST News 3月号, 2012)

1. 平成 21(2009)年 11 月 12 日、日本結晶成長学会第 26 回論文賞
2. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama, Y. Furukawa, “The appearances of two types of quasi-liquid layers at air-ice crystal interfaces observed by advanced optical microscopy”, The 16th International Conference on Crystal Growth, Beijing, China, August 8-13, 2010. 【招待講演】
3. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama, Y. Furukawa, “Two types of quasi-liquid layers at air-ice interfaces visualized by advanced optical microscopy”, The 12th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice, Sapporo, Japan, September 5-10, 2010. 【招待講演】
4. G. Sazaki, Y. Furukawa, “In-situ observation of crystal growth processes by advanced optical microscopy”, 2010 MRS Fall Meeting, Boston, USA, November 29-December 3, 2010. 【招待講演】
5. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama, Y. Furukawa, “Appearance of a novel quasi-liquid layer at air-ice interfaces visualized by advanced optical microscopy”, Symposium DD: CGCT-5 Fundamentals of Crystallization and Low Dimensional Crystallization, International Conference on Materials for Advanced Technologies, Suntec, Singapore, Jun 26-Jul 1, 2011. 【招待講演】

(4)プレス発表

平成22年10月26日 「氷結晶表面の素顔に迫る:単位ステップの運動の直接観察」

平成24年1月10日 「氷の新しい融け方を発見:2種類の異なる表面液体相の生成」

研究報告書

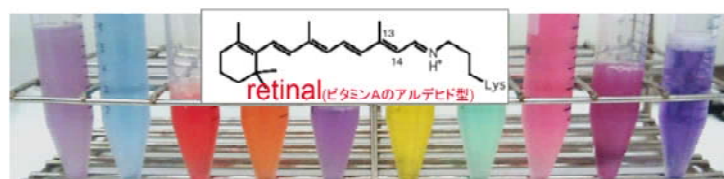
研究課題名：「光機能性・制御性蛋白質による細胞・個体操作」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：須藤 雄気

1. 研究のねらい

光は、生物にとって重要なエネルギー源であり情報源である。生体内で光を受け取る実体は、光を吸収するための発色団を含んだタンパク質分子で、総称して光受容タンパク質と呼ばれる。緑色蛍光タンパク質(GFP)に代表される蛍光タンパク質により、細胞内の現象を可視化(観る)ことが可能となり、広く生命科学者が利用している。レチナール(ロドプシン)タンパク質は、その名の通り、ビタミンAのアルデヒド型であるレチナールを発色団としたタンパク質群の総称で、光によりエネルギー(電気化学ポテンシャル差)を産生するタンパク質、我々の視覚/色覚を司るタンパク質など、多彩な機能の特徴とする(図1)。2000年以降、ゲノムプロジェクトの進展により、5000を越える分子が自然界から見つかった。本研究では、これらロドプシン分子により、細胞や個体を“観る”ことから一歩進んで、“操る”ことが可能なツールを開発することを目指した。



“Rhodopsin”(ロドプシンとは?)

- Having a **retinal** as a chromophore
(発色団としてレチナールを持つ)
- Having **seven transmembrane** α -helices
(7回膜貫通型 α ヘリックス構造を持つ)
- ~5000 **examples** have been isolated from various organisms, showing **various functions**.
(5000を越える分子が発見されており、様々な機能を持つ)

図1: 保持するレチナールタンパク質(ロドプシン)

2. 研究成果

本研究は、研究目的の達成のため、以下の3つの課題を同時並行的に行った(図2)。

- (1) 新しいロドプシンの取得
- (2) それらを含めたロドプシン分子の性質の解析
- (3) ロドプシンを用いた細胞や個体の操作にわかれる

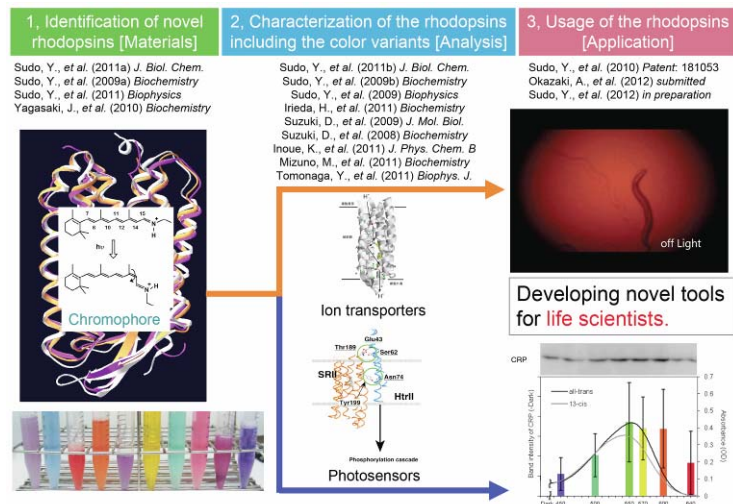


図2: 本研究の流れと成果

(1) ロドプシン分子の同定・単離・精製(図3)

四角形をした古細菌 *H. walsbyi* から微生物由来としてはじめて 11-*cis* 型レチナルを発色団とする分子を発見し、MR と命名した[Sudo et al. (2011a) *J. Biol. Chem.*]. この分子は、微生物型ロドプシンの分子進化を考える上で、光反応、発色団組成、機能分化について興味深い知見を与えた。また、古細菌 *H. vallismortis* から、光センサータンパク質の精製に成功し、HvSR1 と名付けた[Yagasaki et al. (2010) *Biochemistry*]. さらに、光情報を細胞内で処理するタンパク質群の同定・単離・精製に成功した[Sudo et al. (2009a) *Biochemistry*, Sudo et al. (2011) *Biophysics*].

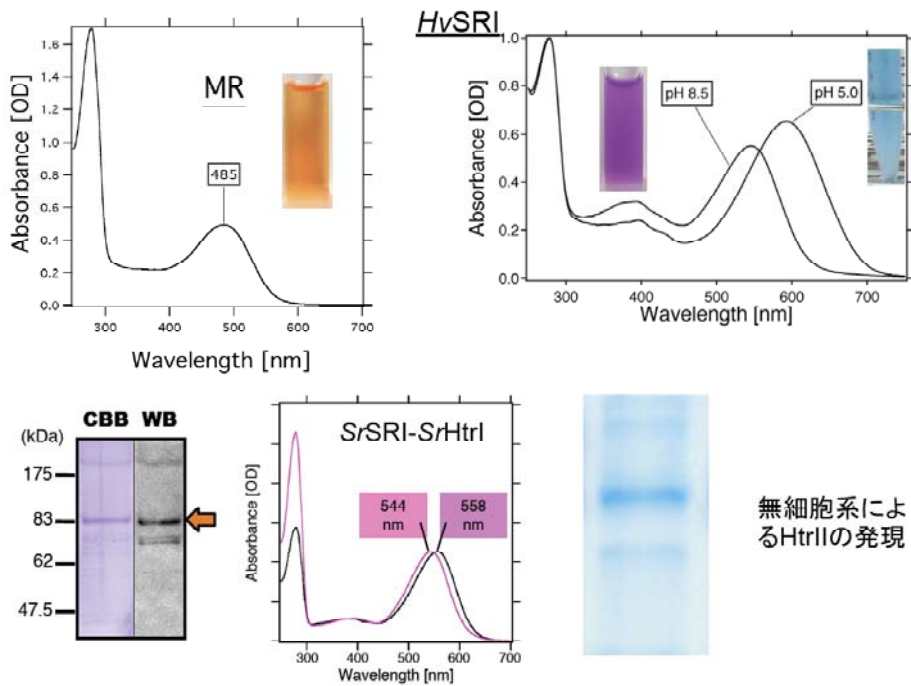


図3: 得られたロドプシン分子と関連分子

(2)ロドプシン分子の性質評価、改変

様々な波長での励起を可能とするため、変異体により、光センサー型ロドプシン[Sudo et al. (2011b) *J. Biol. Chem.*], イオンポンプ型ロドプシン[Sudo et al. in preparation]の波長制御機構を解析し、波長制御の分子メカニズムを明らかにすると共に、490–560nm の人工的波長変換を実現した。また、Cl⁻イオンにより、波長変換が可能であることを発見した[Suzuki et al. (2009) *J. Mol. Biol.*, 朝日新聞、科学新聞など](図4)。さらに、機能発現に至る、構造変化を各種分光法を用いて解析した[Sudo et al. (2009b) *Biochemistry*, Sudo et al. (2009) *Biophysics*, Mizuno, Sudo et al. (2010) *Biochemistry*, Irieda et al. (2011) *Biochemistry*]。

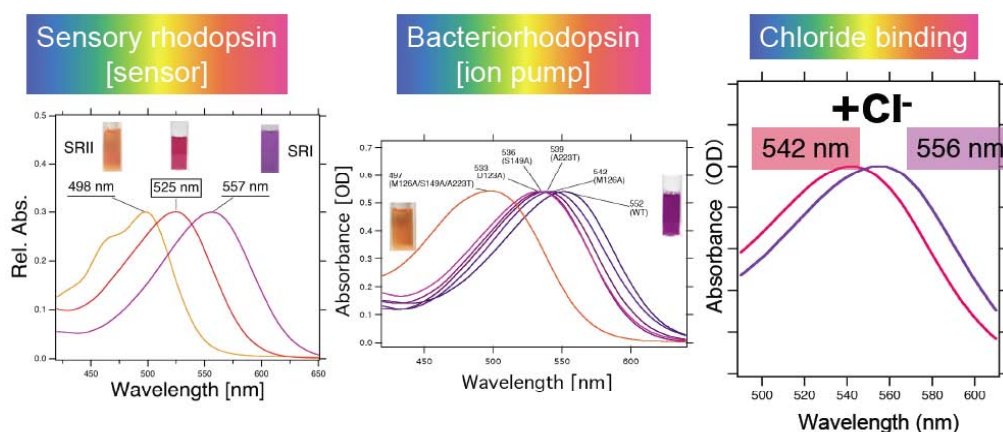


図4: ロドプシン分子の色(吸収波長)の改変

(3)細胞・個体操作

藍藻 (*Anabaena*) 由来のロドプシン、ASR を用いて、光によるタンパク質発現誘導できるシステムを開発した(図5)[須藤ら(2010)特願]。このシステムを大腸菌(単細胞生物)に導入し、細胞の運動性制御が可能なこと[Sudo et al. in preparation]、プロトンポンプ型ロドプシン(Arch)を線虫(多細胞生物)に導入し、個体の運動性制御が可能なることを実証した[Okazaki et al. revised]。

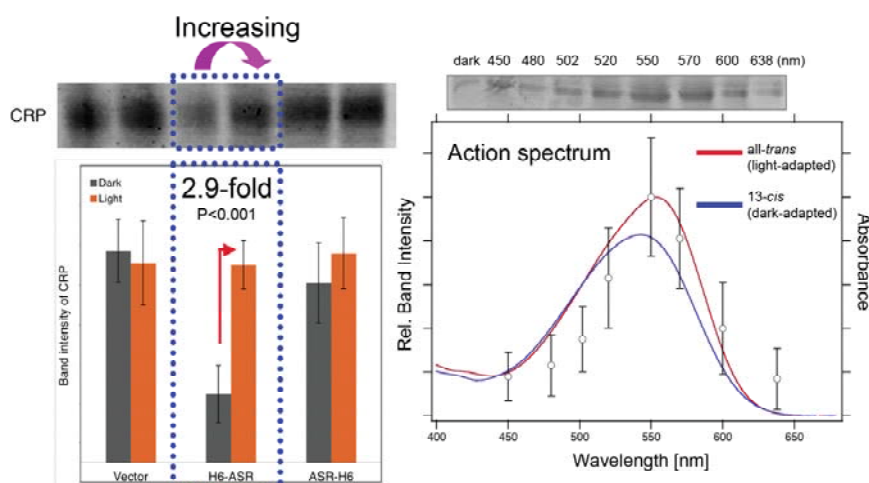


図5: ASR による細胞内タンパク質量のコントロール

3. 今後の展開

本研究では、細胞内の転写活性を光で制御することにより、任意の“タンパク質量”をコントロール出来る系を確立した。また、細胞内外のイオン濃度を光で制御することにより、“神経活動”を制御することに成功した。ロドプシン分子は、この他にも、細胞内キナーゼ活性の ON・OFF やカチオン輸送など、様々な機能を有する。また、本研究で見いだした機能未知ロドプシンや波長バリエーションを利用し、より幅広い生理機能をターゲットとしたロドプシンの利用が期待される。

4. 自己評価

当初掲げた3つの課題、(1)取得、(2)解析、(3)利用について、(1)については、単なる取得にとどまらず、ロドプシン分子の進化過程にも関わる受容体 MR を発見し、(2)については、機能を変えずに、幅広い吸収波長を有する受容体の創成、CFIによる新規波長制御機構、機能発現に重要な構造変化の同定、これまでの常識とは反する異性化反応の発見に成功した。(3)については、生命活動の根幹に関わるタンパク質の量を、光によるコントロール可能な系を確立し、単細胞の行動制御へ応用した。また、イオン輸送型ロドプシン分子を用いて、個体である線虫の制御にも成功した。研究開始時には、同時並行的な研究に多少の不安があったが、むしろ相乗的にそれぞれの研究が進展したと実感している。

5. 研究総括の見解

須藤研究者は、さきがけ研究の提案時まで培っていたロドプシン分子の学理と技術をもとに、新しいロドプシンの探索、光センサー型ロドプシンやイオンポンプ型ロドプシンの波長制御機構の解明、吸収波長変換などの研究を組織的に展開してきた。最終段階では、藍藻由来のロドプシンを用いて光によるタンパク質発現誘導システムを開発し、このシステムを大腸菌に導入することにより細胞の運動性制御が可能なること、プロトンポンプ型ロドプシンを線虫に導入することにより個体の運動性制御が可能なることを実証した。これは、光照射により蛋白質の機能を制御することにより、細胞や個体を操作するという初期の目的を実現したもので、須藤研究者のさきがけ研究に対する姿勢を高く評価している。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. *Sudo, Y., Ihara, K., Kobayashi, S., Suzuki, D., Irieda, H., Kikukawa, T., Kandori, H., & Homma, M. “A microbial rhodopsin with a unique retinal composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties” *J. Biol. Chem.* 286, 5967-5976 (2011a).
2. *Sudo, Y., Yuasa, Y., Shibata, J., Suzuki, D., & Homma, M. “Spectral tuning in sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber*” *J. Biol. Chem.* 286, 11328-11336 (2011b).
3. *Sudo, Y., Okada, A., Suzuki, D., Inoue, K., Irieda, H., Sakai, M., Fujii, M., Furutani, Y., Kandori, H., & Homma, M. “Characterization of a signaling complex composed of sensory rhodopsin I and its cognate transducer protein from the eubacterium *Salinibacter ruber*” *Biochemistry* 48, 10136-10145

(2009a).

4. Suzuki, D., Furutani, Y., Inoue, K., Kikukawa, T., Sakai, M., Fujii, M., Kandori, H., Homma, M. & *Sudo, Y. "Effects of chloride ion binding on the photochemical properties of *Salinibacter* sensory rhodopsin I" *J. Mol. Biol.* 392, 48-62 (2009).【朝日新聞 7/15, 科学新聞 7/24, 中日新聞 7/19, 時事通信 7/14, 共同通信 7/18】
5. Irieda, H., Reissig, L., Kawanabe, A., Homma, M., Kandori, H., & *Sudo, Y. "Structural characteristics around the β -Ionone ring of the retinal chromophore in *Salinibacter* sensory rhodopsin I" *Biochemistry* 50, 4912-4922 (2011).

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件

発明者: 須藤 雄気、入枝 泰樹、本間 道夫

発明の名称: アナベナセンサリーロドプシンを利用したタンパク質発現法

出願人: 名古屋大学

出願日: 2010/8/12

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

【主な国際会議の招待講演】

- 1, Sudo, Y. & Homma, M. "Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsin" 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology (AOCP), Sept 31, Nara, Japan (2011).
- 2, Sudo, Y. "Sensory signal transduction from the sensory rhodopsins to their cognate transducer proteins in microbes" (2010) 14th International Conference on Retinal Proteins, Aug 3, Santa cruz, USA (2010).

【主な国内会議の招待講演】

- 1, 須藤雄気, 本間道夫(発表兼シンポジウムオーガナイザー) "What should we learn from sensory rhodopsins? : Signal transfer mechanism and its application for protein expression" The 49th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan「Photobiophysics promoted by young scientists」, 姫路, 9, 17 (2011).
- 2, 須藤雄気 "7回膜貫通型色素結合タンパク質(ロドプシン)の調製法"第11回・日本蛋白質科学会年会 蛋白質科学会アーカイブワークショップ, 大阪, 6, 9 (2011).
- 3, 須藤雄気、本間道夫 "機能性・制御性膜タンパク質(微生物型ロドプシン)による新しい解析ツールの創成に向けて" 日本薬学会第 131 年会シンポジウム「生体反応・細胞挙動のセンシング-光を使って何ができるのか?-」, 静岡, 3, 29 (2011).
- 4, 須藤雄気 "機能性・制御性膜タンパク質(微生物型ロドプシン)による新しい解析ツールの創成に向けて" 生理研研究会「光操作研究会」, 岡崎, 9, 9 (2010).
- 5, 須藤雄気 (発表兼研究会オーガナイザー) "微生物の走光性:センサリーロドプシンの機能理解から何がわかるか、何をもちたらすか" 分子研研究会「拡がるロドプシンの仲間から」何がわかるか"何をもちたらすか", 岡崎, 3, 23 (2010).

【受賞】

平成21年度光科学技術研究振興財団・研究者表彰

【解説/総説、著書】

- 1, 須藤雄気、本間道夫 "光受容タンパク質による微生物の光センシングの理解とその利用" 薬学雑誌 印刷中
- 2, 須藤雄気、井原邦夫、本間道夫、加茂直樹 "高度好塩性微生物の"目":センサリーロドプシンへの Cl⁻イオン結合の役割" 極限環境微生物学会誌 10, 23-29 (2011).

3, Sudo, Y. “Transport and sensory rhodopsins in microorganisms” CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, the 3rd edition, 1173-1193 (2011).

4, Suzuki, D., Irieda, H., Homma, M., Kawagishi, I. & *Sudo, Y. “Phototactic and chemotactic signal transduction by transmembrane receptors and transducers in microorganisms” Sensors 10, 4010-4039 (2010).

5, 須藤雄気 “ロドプシン研究はどこに行くのか？” 生物物理 50, 160-161 (2010).

【プレス発表】

平成21年7月14日

「細菌が緑色を感じる仕組み—色素たんぱく質の新しい色決定機構」

研究報告書

研究課題名:「分子間相対配置の操作による光化学過程の能動的制御」

研究期間: 平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者: 高木 慎介

1. 研究のねらい

光化学過程は、時間と距離に強く依存する化学過程である。重要なエネルギー変換反応である光合成反応においては、色素分子が適切に配置、配向することで、効率の良いエネルギー移動、電子移動を実現している。光電子移動、エネルギー移動などの光化学反応においては、その速度定数は分子間距離に依存する。分子間距離が大きくなりすぎると、色素自身の励起寿命に打ち勝てず、分子間の光化学過程は低効率なものとなる。一方、分子間距離が小さくなりすぎるといわゆる会合体を生じ、多くの会合体においては、色素分子の励起寿命は著しく短くなり、有効な光化学反応を行うことが困難となる。また、電子移動とエネルギー移動では、その速度定数の分子間距離依存性が異なるので、もし分子間距離を制御することができれば、いずれか一方の過程を優先的にすることも可能となる。従って、高効率な光化学過程を実現するためには、熱力学的要因に加えて、色素分子集合構造、特に、分子間距離の制御が極めて重要となる。生体においては、蛋白質が各分子の配置を制御しているが、無機材料など他のホスト材料による容易な分子配列技術が望まれる。しかし、有機分子は無機表面上において不規則な集合構造をとり、会合体を形成することが多い。このような背景のもと、本研究では、無機ナノシート材料を用いて、色素集合体の構造、特に、距離(空間)の軸を制御し思い通りの光化学過程を進行させることを目的とした。具体的には、層状化合物(粘土鉱物)上に光化学的に活性な色素集合体構造を構築し、太陽光を有効利用するための人工光捕集系の構築を目指した。特に、色素分子集合構造の制御因子について詳細な検討を行い、色素分子集合体のナノレベルでの構造制御の新規手法の提案を試みた。

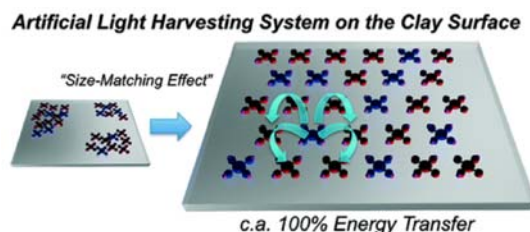


図1 ナノシート上における色素分子集合体の構造制御に基づく人工光捕集系の構築

2. 研究成果

【A. ナノ層状化合物上における色素集合体構造の分子レベル構造制御技術の確立】

本課題では、静電相互作用を利用した色素分子集合体のナノレベル構造制御の原理確立を目指した。具体的には、負電荷を持つ層状化合物(粘土鉱物)をホスト材料として、正電荷を有する色素分子の集合体形成挙動について検討した。これまでに、特定の粘土鉱物(ホスト材料)と色素分子(ゲスト分子)との組み合わせにおいて、色素分子が極めて高密度に存在しながら会合(分子間相互作用による吸収スペクトル変化がある状態)を起こさない現象を見出している。粘土鉱物上の平均負電荷間距離と色素分子内の正電荷間距離が一致した時に起きる現象であることから、Size-Matching Effect(サイズマッチング則)として提唱している。サイズマッチング則が働いているとき、ホストとゲストの間に極めて強い相互作用が生じることから、ゲスト間の相互

作用である会合が抑制できるものと考えられる。本課題では、このサイズマッチング則を飛躍的に発展させるべく、様々な電荷密度を有する粘土鉱物を設計し、水熱合成を行うことを試みた。負電荷間距離の異なる粘土鉱物を用いることにより、複合化される色素の分子間距離を自在に操ることが可能になると期待される(図2)。

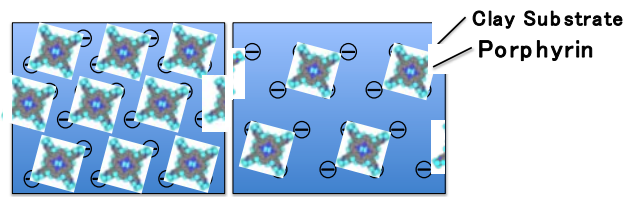


図2 粘土鉱物上における色素分子間距離制御のイメージ

粘土鉱物は、(1)原子レベルで平滑な平面を提供する、(2)密度や発生位置が可変な電荷を有する、(3)容量が可変な層間微小環境を有する、(4)クラーク数の大きな元素のみで構成可能である、(5)化学合成物では完全に無色である、等の特徴を有する。多くの粘土鉱物は負電荷を持っていることから、正電荷を有する有機分子と容易に静電的に複合化する。光機能材料の視点からは、特に化学合成粘土鉱物においては、その分散水溶液や固体膜が透明化できる点も大きな魅力である。粘土骨格の組成式は $[(Si_{8-x}Al_x)(Mg_{6-y}Al_y)O_{20}(OH)_4]^{-(x-y)}$ で表せられる。粘土鉱物の電荷間距離は、表面四面体層 Si の Al による置換率により制御可能である。Al による置換率を変化させた7種類の粘土鉱物の水熱合成を行った。構造確認は、XRD 測定、XRF による元素分析、 ^{27}Al NMR、FT-IR、TG 測定、AFM 観察などにより行った。その結果、 $x = 0.33 \sim 1.61$ のものが得られ、粘土鉱物上の負電荷分布がヘキサゴナルであると仮定すると、平均負電荷間距離が $1.92 \sim 0.83$ nm であることに対応している。

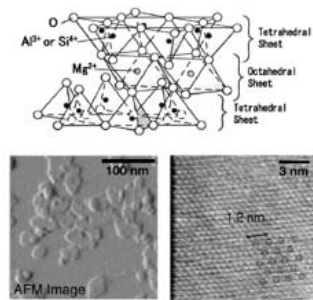


図3 粘土鉱物の構造(上)とAFM像(下)

得られた粘土鉱物と、分子内電荷間距離が 1.05 nm, 1.31 nm である p -TMPyP $^{4+}$, TMAP $^{4+}$ (図4)との水中における複合体形成挙動について検討した。いずれの組み合わせにおいても、ポルフィリンは会合すること無く粘土鉱物上に吸着したが、その飽和吸着量は異なった。ポルフィリンの飽和吸着量を吸収スペクトル測定から求めたところ、飽和吸着時におけるポルフィリンの平均分子間距離は粘土鉱物上の負電荷間距離に応じて変化することがわかった。図5に、粘土鉱物上の負電荷間距離と、飽和吸着時におけるポルフィリンの平均分子間距離の関係を示した。いずれのポルフィリンにおいても、ポルフィリン分子内の正電荷間距離と粘土鉱物表面上の負電荷間距離がほぼ一致した時に、最も平均分子間距離が小さく、すなわち、高密度な吸着が起きていることがわかった。 p -TMPyP $^{4+}$ では、ホスト材料を

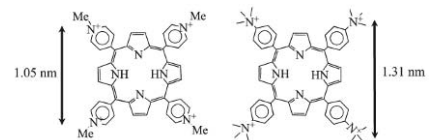


図4 p -TMPyP $^{4+}$ (左)と TMAP $^{4+}$ (右)

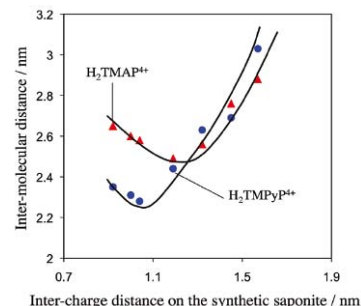


図5 粘土鉱物上の電荷間距離と飽和吸着時におけるポルフィリンの平均分子間距離の関係

選択することで、約 2.3 nm から 3.0 nm の範囲で平均分子間距離を制御できることが明らかとなった。

【B. 粘土鉱物-ポルフィリン複合体からなる人工光捕集モデルの構築】

前課題で確立した高密度に色素が存在しながら会合が起こらない分子配列技術を用いて、粘土鉱物-ポルフィリン複合体における光エネルギー移動反応について検討した。エネルギー供与体として *m*-TMPyP⁴⁺、エネルギー受容体として *p*-TMPyP⁴⁺ を用いた。本検討では、粘土鉱物-ポルフィリン複合体は単層で水中に分散しているものを用いた。*p*-TMPyP の粘土鉱物上における吸収、蛍光波長は、粘土平面上における分子の平面化に伴い大きく長波長シフトしておりエネルギー受容体となりうる。定常蛍光測定、時間分解蛍光測定により、エネルギー移動効率、エネルギー移動速度定数を求めた。*m*-TMPyP⁴⁺ と *p*-TMPyP⁴⁺ の存在比、及び、それらの吸着密度 (vs CEC (粘土鉱物のカチオン交換容量)) を変化させた時のエネルギー移動効率を図6に示した。[*m*-TMPyP]:[*p*-TMPyP] = 1:3 の時、ほぼ 100% の効率でエネルギー移動が進行することが明らかとなった。

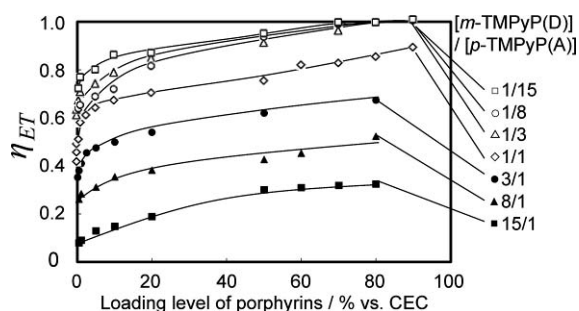


図6 (*m*-TMPyP⁴⁺)-(*p*-TMPyP⁴⁺)-粘土鉱物複合系におけるエネルギー移動効率

詳細な考察を行うため、エネルギー移動反応を時間分解蛍光測定により観察した。エネルギー供与体の蛍光波長領域では減衰が、エネルギー受容体の蛍光波長領域では明確なライズが同じ時定数(0.4 ns)をもって観察された(図7)。この時間分解測定の解析から、エネルギー移動速度定数は $2.4 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ と求められた。ここで驚くべきことは、極めてシンプルな時間分解蛍光挙動が観察されたことである。もし、二種のポルフィリン分子が相分離する等、偏りのある吸着分布を持ったならば、寿命成分は多成分になるはずである。これらの結果は、(*m*-TMPyP⁴⁺)-(*p*-TMPyP⁴⁺)-粘土鉱物複合系においては、二種のポルフィリン分子は極めて均一な混合構造をとっているという重要な事実を示している(図8)。

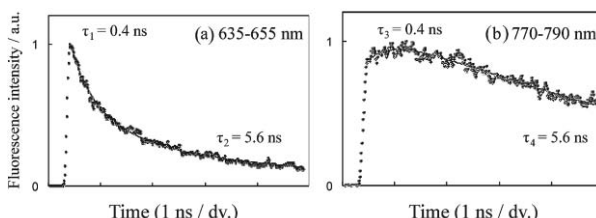


図7 (*m*-TMPyP⁴⁺)-(*p*-TMPyP⁴⁺)-粘土鉱物複合系 (90% dyes loadings vs CEC of the clay, *m*-TMPyP/*p*-TMPyP = 1/3) における蛍光減衰曲線。(a) 635-655 nm, (b) 770-790 nm. 635-655 nm, 770-790 nm の領域はそれぞれ *m*-TMPyP、*p*-TMPyP からの発光に対応している。

以上の観察より、高効率なエネルギー移動反応が達成された要因は下記のようにまとめられる。i) 会合体形成抑制によるエネルギー供与体励起寿命の短寿命化の抑制、ii) 色素分子の固定化によるエネルギー移動過程以外の蛍光消光(電子移動反応等による消光)の抑制、iii) エ

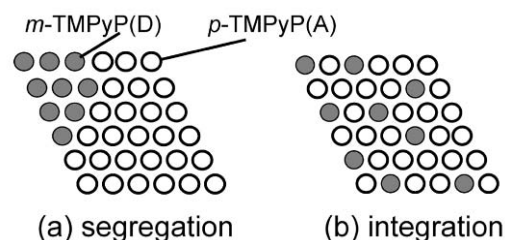


図8 異種色素分子の(a)偏析と(b)均一分布

エネルギー供与体とエネルギー受容体が相分離せず有効な隣接が起きること、などの要因が重要である。いずれの要因の実現に対しても、サイズマッチング則が重要な役割を果たしていると考えられる。すなわち、サイズマッチング則を満たす色素は粘土鉱物表面に強力に吸着しており、ポルフィリン分子の粘土表面での運動が抑制されていると考えられる。電子移動には分子同士の近接が必要であるが、サイズマッチング効果により、分子同士の近接が妨げられ自己消光の原因となる電子移動過程が完全に抑制されたものと考えられる。固体表面、無機ナノシート表面の化学反応においては、iii)の異種分子の有効な隣接は重要な問題である。無機表面では、同種分子が寄り集まることにより図8(a)偏析の状態が見られることが多い。このようなケースでは異種分子同士の接触が有効でなく、分子間反応に対して大きな障害となる。サイズマッチング則の働く系では分子間距離が離れており、分子間での相互作用が弱いいため、(b)均一分布が有利になったものと考えられる。

一方、太陽光の有効利用を考えると、複数の色素を組み合わせると可視光全域を吸収できることが望まれる。本系の特長の一つに容易に色素を追加できることが挙げられる。現在、図9に示すように数種の色素を組み合わせた系について検討しており、各色素間で有効なエネルギー移動が進行することを明らかとしている。特に臨界エネルギー距離が大きくなる色素の組み合わせにおいては、色素どうしが隣接していなくてもエネルギー移動反応が進行する可能性を見出しており、人工光捕集系構築に向けて本系が有望であることが明らかとなっている。

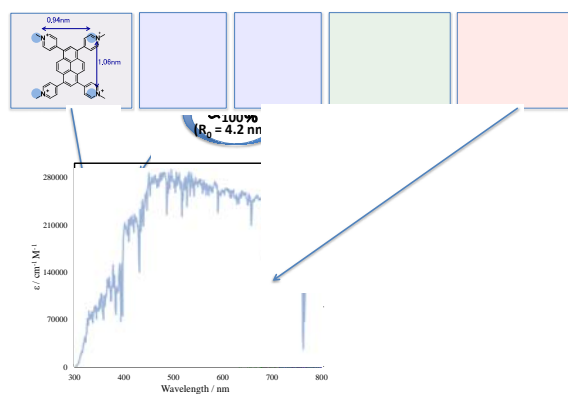


図9 複数の色素を組み合わせた太陽光の有効利用

【C. 粘土鉱物-ポルフィリン複合体における三次元構造の構築】

前課題までの検討では、解析の容易さのために、粘土鉱物-ポルフィリン複合体が単層で水中に分散した系を用いている。このような系では、透明な溶液として扱えるという利点を有するが、更に複雑な系を組み上げたり、実用向けの検討を行う場合には制限が多い。従って、本課題では、(a)ポルフィリンの三次元構造体の作製、及び、(b)粘土鉱物-ポルフィリン複合膜の作製を試みた。ポルフィリンの三次元構造を作製するために図10に示すようなポルフィリンを設計、合成した。TPyCP は炭酸カルシウム共存下、5,10,15,20-tetra(4-pyridyl) porphyrin と 3-bromo propionic acid から合成し、¹H-NMRと元素分析により同定した。

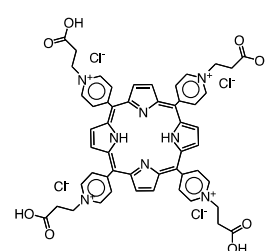


図10 TPyCP の構造

室温下、水中で粘土鉱物-TPyCP 複合体形成挙動を吸収スペクトルにより観察したところ、TPyCP は *p*-TMPyP などのポルフィリンと同様に、ほぼ 100% vs CEC まで無会合吸着

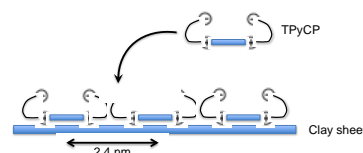


図11 静電相互作用を利用した TPyCP 積層イメージ

することがわかった。ここで、200% vs GEC の TPyCP を含む複合体水溶液を 50°C で一日加熱したところ、興味深いことに吸収スペクトルの変化が観察された。粘土鉱物上でポルフィリン分子間の会合体が生じたと考えられた。遠心分離による検討によれば、粘土鉱物上でのポルフィリン吸着量は 148% と見積もられた。吸収波長の考察から、TPyCP は粘土鉱物上で J 会合体的に一部積層構造をとっているものと考えられた。今後さらに構造が明確で多層の積層構造を作製する必要があるが、ポルフィリン色素積層構造作製のための足がかりを得ることができたと考えている。

一方、粘土鉱物-(*p*-TMPyP)複合体を水中で作製した後、PTFE メンブランフィルターでろ過し、そのろ物をガラス上に転写することで、透明な粘土鉱物-ポルフィリン複合膜を作製することに成功した。この膜においては、周囲の雰囲気に応じて色調が変化するクロミズム現象が見出された。XRD 測定等の検討より、その原理は複合体中におけるポルフィリンの配向変化に基づく興味深いものであることがわかった(図12)。生体系においては、構造や形態の柔軟さが重要な役割を果たすことがわかってきているが、本複合体においては層空間や色素の吸着配向に一定の柔軟さが備わっている。今後、生体で見られるような柔軟性に基づく、周囲の環境に応じた応答機能等の機能発現に興味を持たれる。本課題では、前課題までの学理における研究から更に進んで、機能材料としてのリアリティーを示すことができたと考えている。

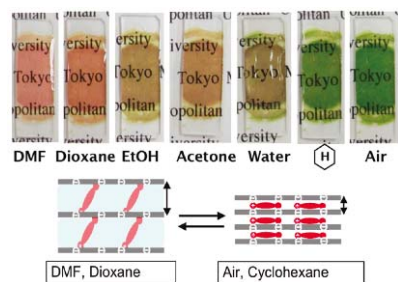


図12 可逆な構造変化に基づくソルバトクロミズム現象

3. 今後の展開

本研究により、粘土鉱物上における色素分子間距離の制御、異種色素混合条件での集合構造制御などが可能であることを見出し、その応用例として人工光捕集系につながり得る高効率エネルギー移動反応を実現した。今後は、粘土鉱物-ポルフィリン複合体を、よりリアリティーのある材料とするために、複合体の三次元構造の作製方法を開発して行きたいと考えている。さきがけ研究期間中には静電引力を利用した色素分子積層を検討したが、さらに、配位結合や水素結合を利用した三次元積層化を検討する予定である。また、実際に手に持てる材料とするためには、固体膜化することが重要である。粘土鉱物-色素複合体の透明膜作製には成功したが、その構造は完全に制御できている訳ではない。石英ガラス基板上に粘土鉱物ナノシートを精密に作製し、それを土台とした色素複合体作製を行なっていきたい。これらの手法を開発することで、物質変換系との連結、または、色素増感太陽電池などへの適用が可能となると考えている。

また、今回のさきがけ研究を通じて粘土鉱物の面白さを再認識することができた。例えば、特記すべきはその構造の柔軟性である。生体では蛋白質がホスト材料となり、誘導適合等、その構造の柔軟性に起因した多くの特異な機能を生み出している。粘土鉱物においても、その層空間や複合体構造は興味深い柔軟性を有している。事実、粘土鉱物-ポルフィリン複合体においては、周囲の環境に応じて複合体構造や層間距離が可逆に変化する柔軟性を示すことが明らかとなった。今後は、このような柔軟性という特長を“光化学”と組み合わせることで、今までに無

い新たな局面を作り出せるものと考えている。

4. 自己評価

さきがけ研究当初は、i)電荷間距離を制御した粘土鉱物の水熱合成、ii)複合化させるポルフィリン色素分子間距離の制御、iii)高効率なポルフィリン分子間のエネルギー移動反応を実現することを最大の目標とした。実際に、ほぼ100%のエネルギー移動効率を実現し、特に、その要因(色素の自己消光の抑制、異種色素の効率の良い混合配置など)を明らかと出来たことは、想定以上の成果であった。数種の色素を混在させて可視光全域を有効利用する光捕集系モデルの構築や、光物質変換系と組み合わせることによる人工光合成系の実現が視野に入ってきたと考えている。一方で、これらの細部の研究に拘り過ぎ、挑戦的課題であった“鑄型粘土鉱物合成”、“複合体構造の三次元化”については、まだ発展途上である。折角さきがけという大挑戦が出来る機会を頂きながら、無意識のうちに結果が出やすい研究に時間を費やしてしまったのではないかという反省がある。今後はこの反省もふまえ、さきがけ研究で得られた研究の芽を大きく伸ばして行きたいと考えている。全体としては、オリジナリティーの高い仕事が出来たと考えており、ナノシート複合系光化学という自分独自の境地を拓く礎を作ることができたと自負している。

5. 研究総括の見解

粘土鉱物上に静電吸着する色素分子の分子間相対配置を制御し、高効率に光反応を進行させる系の構築を謳った提案であったが、概念的には提案時まで提出されていたもので、研究開始後如何に進展するか若干不明な時期もあった。しかし高木研究者はさきがけ研究の趣旨をよく理解し、従来の枠組みを破るべく、三次元構造の構築を試みる一方、粘土鉱物の酸化還元反応による構造制御、鑄型合成、単層膜化による展開を図っている。新規物質の合成、一連の化合物の系統的検討など化学研究の本領を發揮し、最終的には新しい粘土系光化学研究が見え始めている。この研究ストリームのリーダーとして一層の研鑽を期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Y. Ishida, T. Shimada, D. Masui, H. Tachibana, H. Inoue, S. Takagi, Efficient excited energy transfer reaction in clay/porphyrin complex toward an artificial light-harvesting system, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14280.
2. T. Egawa, H. Watanabe, T. Fujimura, Y. Ishida, M. Yamato, D. Masui, T. Shimada, H. Tachibana, H. Yoshida, H. Inoue, S. Takagi, Novel methodology to control the adsorption structure of cationic porphyrins on the clay surface using the “size-matching rule”, *Langmuir* **2011**, *27*, 10722.
3. S. Takagi, S. Konno, Y. Aratake, D. Masui, T. Shimada, H. Tachibana, H. Inoue, Effects of Porphyrin Structure on the Complex Formation Behavior with Clay, *Microporous & Mesoporous Materials*, **2011**, *141*, 38.
4. Y. Ishida, D. Masui, H. Tachibana, H. Inoue, T. Shimada, S. Takagi, Controlling the micro-adsorption structure of porphyrin dye assembly on clay surfaces using the

“size-matching rule” for constructing an efficient energy transfer system, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2012**, *4*, 811.

5. S. Takagi, T. Shimada, D. Masui, H. Tachibana, Y. Ishida, D. A. Tryk, H. Inoue, Unique Solvatochromism of a Membrane Composed of a Cationic Porphyrin-Clay Complex, *Langmuir*, **2010**, *26*, 4639.

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

【受賞】

・2009年9月 日本粘土学会奨励賞

【海外国際会議招待講演】

・2010-Trilateral Meeting on Clays (The Clay Mineral Society (CMS), the Clay Science Society of Japan (CSSJ) and the Spanish Clay Society (SEA)) (スペイン、セビリヤ) : Plenary Lecture
講演タイトル“EFFICIENT PHOTOCHEMICAL ENERGY TRANSFER REACTIONS IN CLAY-PORPHYRIN COMPLEXES”

・Pacifichem2010 (米国、ハワイ) : Invited Lecture

講演タイトル“The Molecular Orientation Control of Cationic Porphyrins on Clay Surface”

・Academia Sinica & JST Joint Workshop on “INNOVATIVE USE OF LIGHT AND NANO/BIO MATERIALS (2011)” (台湾、台北) : Keynote Lecture

講演タイトル“Active control of photochemical processes by manipulation of intermolecular distances”

・the third International Forum on Photoenergy Future 2011 (IFPF2011)(韓国・済州島) : Invited Lecture

講演タイトル“Efficient energy transfer in clay-porphyrin complexes by controlling molecular adsorption structure”

【その他国際会議、国内会議招待講演】

・日本化学会第 89 春季年会(2009) (中長期テーマ“分子系包接環境における光化学” : 特別講演

講演タイトル“ナノ層状環境におけるポルフィリンの光化学”

・JSPS Asian CORE Program China-Japan Joint Symposium on Functional Supramolecular Architectures. at Sapporo(2009): Invited Lecture

講演タイトル“The Control of Supramolecular Structure and Photochemical Properties of Clay-Porphyrin Complexes”

・第 4 回日本化学会関東支部大会(セッション:「光エネルギー変換の未来」)(2010): 依頼講演

講演タイトル: “ナノ層状粒子上の分子配列操作による光化学過程の能動的制御”

・NIMS International Symposium on Photocatalysis and Environmental Remediation Materials

2011 (Tsukuba) :Invited Lecture

講演タイトル:“Quantitative energy transfer reaction in clay/porphyrin complex toward an artificial light-harvesting system”

- ・日本化学会春季年会“2011 世界化学年”記念 JST さきがけ研究領域合同シンポジウム「人類の危機に挑む研究開発:光と太陽エネルギー」

講演タイトル“分子間相対配置の操作による光化学過程の能動的制御～人工光捕集系の構築”

- ・第 6 回 Clayteam セミナー“Materials Innovation in Sendai”(仙台)(2011):招待講演
講演タイトル“粘土鉱物—色素複合体における分子レベル構造制御と機能性”
- ・島根大学研究講演会「S-グリーン・ライフナノ材料プロジェクト:次々世代低コスト太陽電池の開発 スマート光—エネルギー変換システム構築に向けた最新の取組」(2011):招待講演
講演タイトル“太陽光の有効利用を目指したナノシート型人工光捕集系の開発”
- ・日本化学会第 92 春季年会(2012)特別企画「次元性がもたらす新しい分子機能」
講演タイトル“分子間相対配置の操作による光化学反応の制御”

【著作物、総説等】

- ・セラミックス, 2008, 43, 21-26. :依頼執筆
機能性色素粘土複合体 (特集 粘土の応用の新展開 記事)
- ・化学工業(10月号、2009):依頼執筆
“ナノ層状環境の蛋白質と類似した機能性”
- ・光化学(2009, 40, 105-109) (依頼執筆)
“無機ナノシート—色素複合体の興味深い光化学挙動”
- ・材料の科学と工学, 2009, 46, 13-18. :依頼執筆
“ポルフィリン色素—粘土鉱物の特異な複合体形成挙動”
- ・『革新機能材料の開発と応用展開』(CMC 出版、2012):依頼執筆
“無機ナノシートの表面構造を利用した分子配列制御 ～人工光合成系構築を目指して～”
- ・層状化合物、化学の要点シリーズ(編集:日本化学会、出版:共立出版)、近日発刊予定

研究報告書

研究課題名：「軟X線レーザーによる時間分解分子軌道イメージング」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：新倉 弘倫

1. 研究のねらい

物質の構造変化やその要因を探るためには、物質の変化速度に応じた時間分解能を持つ測定手法の開発が必要になる。1960年代にレーザーが開発されて以来、レーザー光は原子分子から生態系まで、様々な物質の性質や構造を測定するための検出光源として使用されてきた。2000年代からはレーザーのパルス幅および測定分解能は1フェムト秒(= 10^{-15} 秒)を下回り、アト秒(1アト秒 = 10^{-18} 秒)の時間領域が達成されている。一般に、分子振動は数十フェムト秒の時間領域で起こるが、アト秒領域の時間分解能が得られれば、分子振動に影響されることなく、分子内の電子波動関数の空間構造を測定することが可能になる。

分子内の電子波動関数は特に分子軌道と表現される。化学反応は、分子構造の変化や解離、分子を構成する原子の組み替えを伴う。化学反応の進行に際して、どのように分子構造が変化していくのかはフェムト秒レーザーパルスを用いて測定されている。しかし、化学反応の選択性や反応速度などは、フロンティア軌道理論等に示されるように、分子軌道の対称性や広がり、位相によって決まる。そこで本研究では、軟X線高次高調波を利用して、分子軌道の形状変化をアト秒～フェムト秒の時間分解能で測定する方法論を開発することをねらいとする。

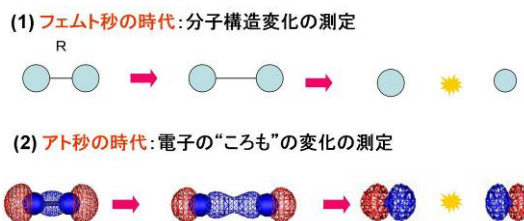


図1 研究のねらい

2. 研究成果

軟X線高次高調波(レーザー)は、 10^{14} W/cm² 程度の尖頭強度を持つ、赤外の高強度レーザーパルスを気相の原子や分子に照射することによって発生する。高強度レーザー電場中に分子が置かれると、分子中の電子の感じるポテンシャルがレーザー電場によりゆがみ、束縛された電子波動関数の一部が連続状態にイオン化する。この過程はトンネルイオン化と呼ばれる。トンネルイオン化した電子波動関数の一部は、レーザー電場の1周期以内の時間に元の分子に加速されて戻り、再衝突する。再衝突時に電子の衝突エネルギーが光のエネルギーに変換されると、高次高調波と呼ばれる極端紫外～軟X線領域の光が発生する。ここでは軟X線高次高調波発生過程を用いて、分子軌道の時間変化を測定する方法「アト秒時間分解分子軌道コヒーレンス法」を新たに開発した。以下に、関連する具体的な研究成果を記す。

(1) 二波長のレーザーを用いた新たな分子軌道対称性測定法の開発

従来の分子軌道の空間広がりを測定する方法(分子軌道トモグラフィー法)は、トンネルイオン化確率が分子軸からの角度に大きく依存しない σ 対称性を持つ軌道に対して用いられたが、一方で π 軌道のように、分子軸とそれに垂直な方向に顕著な波動関数の節を持つ分子軌道の場合には、トンネルイオン化確率の角度依存性のため従来の方法をそのまま適用することは困難だった。多くの分子は、最高占有軌道(HOMO)に π_g 対称性を持つため、この方法の適用には限界があった。

本研究では、分子軌道トモグラフィー法における直線偏光のレーザーパルスと分子配向制御を用いる方法に代わり、アト秒精度で変化する時間依存偏光高強度レーザーパルスを用いることで、 π_g 軌道のように波動関数に節がある分子軌道に対しても、対称性と広がりの測定が可能

であることを実験的・理論的に示した。具体的には、波長の異なるフェムト秒レーザーパルスを、それぞれの偏光軸が垂直になるように重ね合わせ、測定対象となる分子に照射する。分子から発生した高次高調波のスペクトル強度とその相対的な偏光方向を、二つのレーザーパルスの位相差の関数として測定する。その高次高調波の偏光方向二次元図(高調波のエネルギーと、元のレーザーの位相差の二つの変数の関数)から、分子軌道の対称性と広がりを読み取る。元のレーザーの位相差を変えると、分子軸に対する電子のトンネルイオン化および電子再衝突角度が0~最大90度まで変わる。

この方法を用いて、重水素分子(D₂)・窒素分子(N₂)・二酸化炭素(CO₂)・亜酸化窒素(N₂O)等に対して高次高調波偏光二次元図を測定した(図2)。その結果、水素分子および窒素分子と二酸化炭素・亜酸化窒素とは、高次高調波の偏光方向が大きく異なることが観測された。例えば、水素分子と窒素分子では、高次高調波の偏光方向は電子が再衝突する方向に沿うが、二酸化炭素と亜酸化窒素では、分子軸に水平な方向に電子が再衝突した場合、それと垂直な方向の偏光を持つ高次高調波が発生することがわかった。

この違いは、分子軌道の対称性による。すなわち水素・窒素分子では最高占有軌道がσ_g軌道であるのにたいして、二酸化炭素・亜酸化窒素の場合は最高占有軌道がπ_g(または擬π_g)対称性を持つことに起因する。半古典的な計算を用いて、実験結果とモデル計算が一致することを明らかにした。

実験結果は、分子軌道の対称性や広がりを顕著に反映し、新たな分子軌道測定法を提示したものである。本研究成果は、アメリカ物理学会誌に掲載され、日経産業新聞等で報道された。

(2) 分子軌道時間分解測定法の開発

次に時間の経過と共に分子軌道(電子波動関数)の空間広がりが変化していく様子を測定する方法を開発した。この方法では、測定対象となる分子から放出される高次高調波の偏光方向の時間変化に注目する。高次高調波の偏光方向は、分子の電子波動関数(分子軌道)の対称性・空間広がりが位相が変化すると、それに依って変化するので、偏光方向の時間変化を追跡することで、分子軌道の変化を測定することが出来る。高次高調波のエネルギーはトンネルイオン化してからの時間に対応し、本研究の実験条件では800アト秒~1400アト秒が測定範囲になる。それぞれの時刻における分子軌道の形状は、(1)で示したように異なる波長を持つレーザーを重ね合わせ、それを分子に照射し高次高調波のスペクトルをレーザーの位相差の関数として測定するという方法で同定する。

図3(a)にエタン分子から、(b)に水素分子から発生した高次高調波の偏光方向二次元図を示す。縦軸に二波長の位相差、横軸に高次高調波のエネルギーと、それから変換したトンネルイオン化してからの時間を表す。トンネルイオン化してから0.8fs付近では、(a)の偏光方向の分布は(b)と同様の二波長位相差で観測されるが、1.2fs付近では(a)の偏光方向は(b)のそれとは大きく異なる。(b)の水素分子の場合には、分子軌道が時間変化しないので、観測結果はエタン分

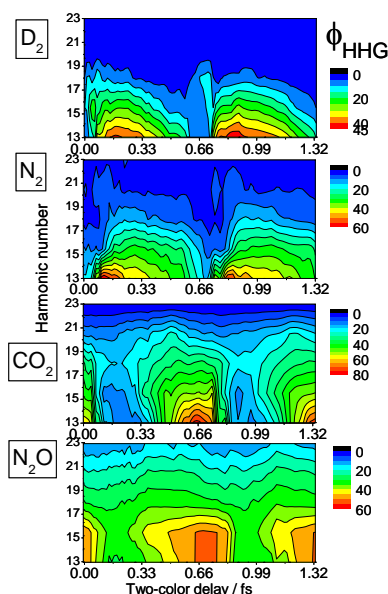


図2 分子から発生した軟X線高次高調波の相対的な偏光度(カラスケール、度)。横軸は二つのレーザーの位相差、縦軸は高次高調波の次数(一次=1.55eV)を表す。分子による偏光度分布の違いは、分子軌道の対称性の違いに起因する。

子内の分子軌道の空間分布が変化していることを意味する。

観測された分子軌道の変化は、トンネルイオン化時に複数の電子状態(分子軌道)から電子が放出されることによって生じる。このとき、複数の分子軌道間、本研究の場合には最高占有軌道(HOMO)とそれよりもひとつ垂直イオン化エネルギーが大きな軌道(HOMO-1)との間に、ある位相差 $\phi(0)$ が決まる。この位相差は、二つの軌道間のエネルギー差 ΔE を用いて $\phi(t) = \Delta E \cdot t / \hbar + \phi(0)$ と表される式により時間発展し、それぞれの時刻 t での分子軌道は二つの軌道をもその位相差およびある分配比でコヒーレントに重ね合わせたものになる。トンネルイオン化時が変化のスタート時になり、時刻 t が経るにつれて、分子軌道の形状が変化していく。

本研究では、HOMO と HOMO-1 のエネルギー差 ΔE を光電子分光法などによって得られる既知のものとして、初期位相差 $\phi(0)$ 等をパラメーターとして高次高調波の二次元偏光図を計算した。計算結果と実験で得られた図との比較により、初期位相差 $\phi(0)$ 等を同定した。得られた各時刻での分子軌道を図3下に示す。800 アト秒～1200 アト秒の400 アト秒の間の変化が、測定された二次元図上では大きな偏光方向の違いとなって観測されていることがわかり、この方法は分子軌道変化を敏感に反映することがわかる。この研究結果は、初めて分子の電子波動関数の変化をアト秒で測定したものである。本研究結果はアメリカ物理学会誌に掲載され、朝日新聞等で報道された。

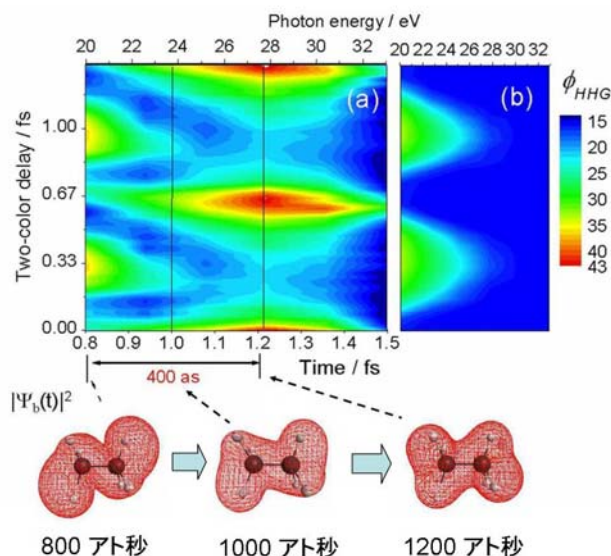


図3 (a)エタン分子、(b)水素分子から発生した高次高調波の偏光二次元図。下図は得られたエタン分子の分子軌道が変化の様子を示す。

(3)高次高調波スペクトルと一光子イオン化過程の関係の同定

軟X線高次高調波のスペクトルから、原子のイオン化に関する情報を得る方法を開発した。アルゴン原子から発生した高次高調波スペクトルは、約52eVに強度のへこみを持ち、このへこみが現れるエネルギーは高次高調波を発生させるレーザーパルスの強度に依らないことを観測した。このへこみは、アルゴン原子を極端紫外光で励起したときに観測される、クーパー極小と呼ばれるスペクトルの強度へこみに対応する。このへこみが現れるエネルギーは、連続状態の電子波動関数を平面波で近似した場合には実験値と計算値は一致しない。一方、アルゴンの3p軌道からsおよびd対称性を持つ連続状態の電子波動関数を用いると、実験値と一致する。すなわち、高次高調波は、一光子光イオン化過程の逆過程になっており、高次高調波のスペクトルはそのエネルギー領域での光イオン化の断面積に対応することを明らかにした。このことにより、軟X線領域の放射光のような連続波長可変な光源を用いることなく、分子のイオン化断面積を高次高調波から得ることが出来ることを示した。本研究結果はアメリカ物理学会誌に掲載された。

(4)アト秒電子非弾性散乱法による部分散乱断面積の測定

軟X線高次高調波は、気相の原子・分子をトンネルイオン化したときに分子から離れる電子が、レーザー電場によって再衝突する際に生じる。再衝突の際に、高次高調波を発生する過程

だけではなく、電子が分子のポテンシャルにより散乱される過程が生じる。散乱された電子の運動量(運動エネルギーと分子軸からの角度)を測定することで、分子軸からの角度とエネルギーの関数として、分子イオンと電子との部分散乱断面積が正確に得られることを示した。分子はレーザー電場中にあるにも関わらず、部分散乱断面積にはその影響は無視できることがわかった。この測定は、従来のイオン-電子衝突法では測定が困難な、分子軸からの角度に依存した散乱断面積を実測できるという優れた利点を有するものである。本研究結果はアメリカ物理学会誌に掲載された。

3. 今後の展開

本研究の意義として、アト秒時間分解能で分子の電子波動関数(分子軌道)の形状変化を測定することに成功したこと、すなわち化学反応動力学における新たな分子軌道測定法を開発したことがあげられる。これらの成果は、時間分解分光の最先端にあるのみならず、電子衝突や化学反応研究、また将来の超高速量子コンピューティング等への展開が期待される。

測定した分子軌道の時間変化は、前述のように「高強度レーザー電場中におけるトンネルイオン化過程」により生じ、アト秒の時間領域で変化する分子軌道である。一方、この方法はフェムト秒以上の時間スケールで起こる化学反応研究にも応用可能である。常温~100 度程度で気化する分子であれば本方法を適用できるので、ポンププローブ法を併用することで、さらに大きな(炭素数が7程度以上の)分子の光反応に際する分子軌道変化を追跡することが可能である。また、高強度レーザー照射による構造変化を測定する方法と組み合わせることで、振動波動関数と電子波動関数との双方の変化を同時に追跡する方法の開発などを展開する。このことにより、フロンティア軌道理論の実験的検証を含む、より一般的な超高速反応測定法を確立する。

また、本研究では高強度レーザー電場中で分子をトンネルイオン化したときに、複数の分子軌道がコヒーレントに相互作用し、電子運動(分子軌道の変化)が生じることを実験的に明らかにした。エタン分子の場合、二つの分子軌道間の位相差が 0.4π になることがわかった。この位相差はトンネルイオン化過程が生じる100アト秒以内に起こる。この観測結果は、このような100アト秒以下で起こるイオン化ダイナミックスの詳細を明らかにすること、および複数の波動関数の初期位相はどのように決まるのかという新たな問題を提示した。これらの問いは、さらなるアト秒時間分解測定法の開発を促すものであり、アト秒パルスを用いた測定に展開させる。

観測した分子軌道変化は、分子の振動運動(CC振動運動)よりも速い時間で生じる。すなわち分子振動に擾乱されることなく、純粋に電子だけがスイッチングする過程と見なすことができる。そのスイッチング過程は、例えば図3(a)の800アト秒と1200アト秒の間で見られるように、軟X線高次高調波の偏光方向として読み出される。これらの基礎過程を用いることで、超高速情報への展開を考える。

4. 自己評価

研究成果の項目に記した中で、特に(2)が当初目標に合致する研究内容といえる。本研究では、(1)新しい時間分解分光法を提案し、それを実験と計算の双方から測定できることを示したこと、(2)その結果として、分子軌道の時間変化をアト秒精度で測定することに初めて成功した。これらは分子軌道を時間分解で測定できるようにしたものであり、かつアト秒科学の大きな目標の一つを達成したものと、論文として成果を発表できたことは非常に意義のあることと考える。特に、観測のどこに注目して、実験結果からどのような情報を得て、それをどのように解析するかという方法を開発することも重要な要点であった。

これまで、化学反応途中の電子状態の情報を得る方法として、フェムト秒時間分解光電子分光法や、アト秒軟X線パルスを用いた時間分解光電子分光法が試みられていた。しかし、光電子分光法で得られる分布は中性分子とイオン状態との両方の情報を含み、その解析は複雑な分子であるほど困難になる。特に、分子の電子波動関数の空間広がりとその位相を直接測定することは

難しい。また近年、軟X線領域での時間分解吸収分光法を用いて、Kr原子内の電子運動を測定した例があるが、複雑なエネルギー準位を持つ分子についての適用は難しく、また測定できた場合でも、波動関数の形状や位相に関する情報を得ることは困難であると考えられる。

本研究で開発した方法は、これらの方法に比べると極めて容易に様々な分子の分子軌道の対称性と広がりやその変化を得ることが出来る、より一般的なものである。一方、この方法を用いて、フロンティア軌道理論などの実験的な直接検証を行うことを計画したが、研究期間内にはそこまでは進展しなかった。今後、大きな分子を用いて、さらに研究を進展させ、アト秒時間分解分光法と反応動力学の双方ともにインパクトのある研究を展開したい。

5. 研究総括の見解

空間と時間に関する高分解能化は、あらゆる研究分野における永遠のテーマである。時間に関しては、Ultrafast Phenomena という国際会議があるように、科学者は常に計測の時間分解能向上を図ることにより、様々な自然現象を明らかにしてきた。新倉研究者は、2000年初頭より、高強度レーザーパルス光を気相の分子に照射して生じる、軟X線高次高調波発生過程などを利用したアト秒測定法の開発に取り組んできた。本さきがけ研究では、これまでに開発してきた手法をさらに発展させ、化学反応途中の分子における電子準位や分子軌道の空間分布の変化を実時間測定することを目指した。その成果の一つとして、400アト秒の間にエタン分子の分子軌道の空間分布が変化する様子を捕らえることに成功した。この成果は世界初の快挙であり、物理・化学現象を電荷分布の変化としてではなく、電子の波動関数の変化として理解する道を開いたことになる。新倉研究者のこの研究成果はさきがけ研究の好例として高く評価される。

6. 主な成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. “*Observation of Electronic Structure Minima in High-Harmonic Generation*”, Hans Jakob Wörner, Hiromichi Niikura, J. Bertrand, P. B. Corkum and D. M. Villeneuve, **Physical Review Letters** **102**, 103901 (2009).
2. “*Frequency resolved high-harmonic wavefront characterization*”, Eugene Frumker, G. Paulus, H. Niikura, D. M. Villeneuve and P. B. Corkum, **Optics Letters** **34**, 3026 (2009).
3. “*Mapping Molecular Orbital Symmetry on High-Order Harmonic Generation Spectrum Using Two-Color Laser Fields*”, Hiromichi Niikura, Nirit Dudovich, D. M. Villeneuve and P. B. Corkum, **Physical Review Letters** **105**, 053003 (2010).
4. “*Probing the Spatial Structure of a Molecular Attosecond Electron Wave Packet Using Shaped Recollision Trajectories*”, Hiromichi Niikura, Hans Jakob Wörner, D. M. Villeneuve and P. B. Corkum, **Physical Review Letters** **107**, 093004 (2011).

(2) 特許無し

(3) 国際学会発表数: 8回 (内1回招待講演)

(4) プレスリリース 2件: 以下の様な新聞で取り上げられた。

- 「分子の電子雲 直接観測」日経産業新聞 2010年9月1日
- 「電子の空間運動 アト秒スケールで観測」化学工業日報 2011年9月1日
- 「分子の電子雲、動き補足」日経産業新聞 2011年10月07日
- 「電子の一瞬 切り取る光」朝日新聞 2011年10月10日
- 「最先端研究、未来開く」日経産業新聞 2011年10月21日

研究報告書

研究課題名：「単一分子蛍光計測で探るキラリティーの本質」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：深港 豪

1. 研究のねらい

キラル分子は互いに重なり合うことのない一対の鏡像異性体を有する分子である。これらの異性体間で、薬の効能や味覚・嗅覚といった我々の生命現象に対する作用が全く異なる場合が多く、これらを計測・識別することは古くから重要な課題として認識されている。近年ではキラル計測技術のダウンサイジングが切望されており、顕微鏡下におけるキラル計測技術の開発が活発に行われている。本研究では、キラル計測技術の究極的な到達点ともいえる単一分子レベルでのキラル計測の実現を目指し、単一分子蛍光計測を応用した単一分子キラル計測技術を確立することを目的とした。分子一つ一つのキラル応答を直接計測することにより多数分子の平均化の影響を取り除き、これまでほとんどの議論が分子集団系においてのみ行われてきた分子のキラリティーという化学的性質の本質をとらえることを目指した。

2. 研究成果

2-1. 単一分子キラル蛍光計測に向けた蛍光性キラル分子の探索

単一分子レベルでのキラル蛍光計測を可能とするためには、高い蛍光量子収率、大きなモル吸光係数を有し、さらに優れた光耐久性を有する蛍光分子の中で、大きなキラル応答(異方性因子: g で表わされる)を示す蛍光性キラル分子を用いることが必要不可欠となる。この観点から、高い蛍光量子収率と大きなモル吸光係数を有し、非常に優れた光耐久性を誇るペリレンビスイミド誘導体を基本骨格とする蛍光性キラル分子の開発に取り組んだ。

分子のキラリティーの源は、4 つの単結合の置換基がすべて異なる不斉中心によるものや、励起子相互作用に基づくもの、らせん軸によるものなど、その種類は様々である。キラリティーの種類ごとに分子の g 値のもつ意味が異なっているものと考えられる。その関わりを明らかにすることが分子のキラリティーの化学的な本質を理解する上で重要であると考え、不斉源の異なる種々の分子(図 1 に一例を示す)を合成した。

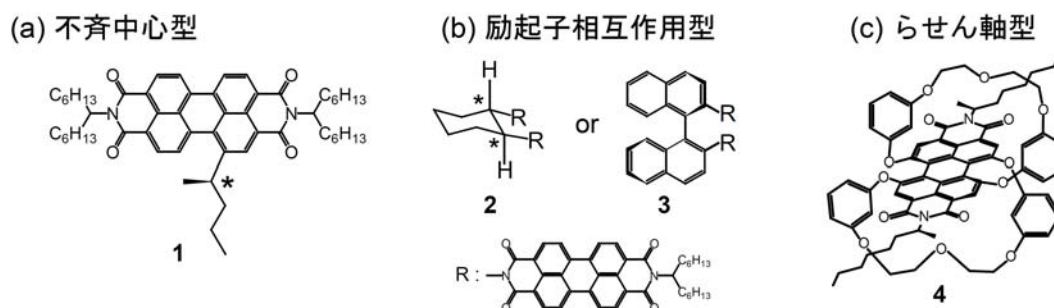


図 1 蛍光性キラル分子 1-4

不斉中心型の蛍光性キラル分子として、図 1 に示す分子 1 を合成した。合成した分子 1 は高い蛍光量子収率($\Phi_f = 0.81$)を示し単一分子蛍光計測は問題なく行えたものの、キラル応答は非

常に小さいものであり($g = \pm 0.00022$)、単一分子レベルでのキラリ計測に用いることは困難であった。励起子相互作用型の蛍光性キラリ分子として、キラリな空間配置をとるビナフチル基やシクロヘキシル基にペリレンビスイミドを結合させた分子 2 および 3 を合成した。その結果、これらの分子は高い蛍光量子収率を有し($\Phi_f > 0.9$)、モル吸光係数も大きく($\epsilon > 110,000$)、単一分子蛍光計測に適した分子であった。また、キラリ応答も合成した分子の中では大きく($g = > \pm 0.002$)、単一分子レベルでのキラリ計測に用いる分子として有力候補であった。しかしながら、励起子相互作用型のキラリ分子の場合、二つの蛍光ユニットを分子内に有することから分子内でのエネルギー移動の影響を考慮する必要があるだけでなく、分子配向とキラリ応答の相関性を評価する際(2-3項)や理論解析を行う際(2-4項)に、議論を複雑化してしまう問題があった。一方で、ペリレンビスイミド骨格のベイポジションを上側と下側で対角線上にエチレングリコール鎖を結合させペリレンビスイミドの π 共役平面をらせん状にねじった分子 4 の場合、蛍光量子収率とモル吸光係数が少し低下したものの($\Phi_f = 0.73$, $\epsilon = 37600$ in diethylether)、単一分子蛍光計測は十分に可能であり、かつ励起子相互作用型の蛍光性キラリ分子と同程度のキラリ応答($g = \pm 0.0018$)を示した。発色団が一つであることから、分子内エネルギー移動等の問題もなく、あらゆる議論を単純化できることから単一分子キラリ計測に最も適した分子であると判断した。

2-2. 単一分子レベルでのキラリ計測に向けた測定光学系の構築

分子のキラリティーを計測する際には、光の持つ偏光特性が有効に利用できる。吸収現象においてキラリな分子は、右円偏光と左円偏光の吸収のしやすさに偏りを持つ円二色性(Circular Dichroism: CD)という性質を有しており、これらの偏り度合いを測定することで g 値が求められ、分子のキラリティーを評価することが可能となる。この性質を基に、単一分子計測が可能な感度の高い蛍光特性を用いて、CD を測定する蛍光検出型円二色性(FDCD)測定を顕微鏡下で行える光学系の構築を行った。

顕微鏡下におけるキラリ計測では、測定試料や光学部品から生じる偽のシグナル(アーティファクト)の寄与を含む危険性が高く、得られるキラリ応答が真に分子のキラリティーに由来するものではない場合がある。従って、考えうるすべてのアーティファクトの影響を除去(もしくは可能な限り低減)した測定光学系の構築を検討した。種々の検討を重ねた結果、図 2 に示す単一分子 FDCD 計測用の光学系を構築した。試料を励起するレーザー光を倒立型蛍光顕微鏡の上側に配置し、 $\lambda/2$ と $\lambda/4$ 板に通して 1 : 1.03 程度の偏光比の円偏光を調整した。光学部品による偏光特性の乱れを回避するために、円偏光作製後、分子を励起するまでのパスには光学部品

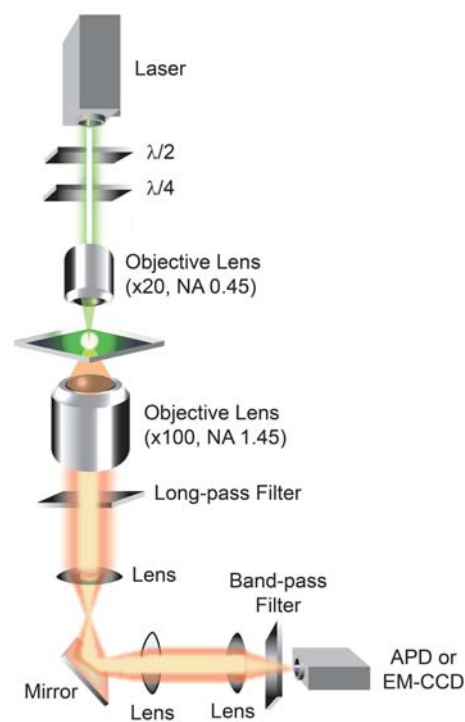


図 2 単一分子 FDCD 測定光学系

を入れず、集光レンズによる偏光面の回転を回避するために比較的小さな開口数の対物レンズで集光して試料を照射した。試料からの蛍光は、反対側の高い開口数の対物レンズで集光し、適切なフィルターを通したのちアバランシェフォトダイオード(APD)やEM-CCDカメラで検出した。 $\lambda/4$ 板を 90° ずつ回転させ右円偏光と左円偏光を切り替えながら試料を励起し、その蛍光強度の差から分子一つ一つの g 値を求め、そのキラリティーを評価した。測定に用いる試料として、光学分割した鏡像異性体をそれぞれ別々に Zeonex や PMMA 高分子媒体に非常に希薄な濃度で分散させ、分子一つ一つが孤立した状態にあるフィルムを作製した。この際、試料媒体による複屈折などの影響をなくすために、試料の厚みは 100 nm 以下になるように厳密に調整した。

2-3. 単一分子 FDCD 計測

2-2項で示した測定光学系と試料を用いて、単一分子レベルでの FDCD 計測を行った。 $\lambda/4$ 板を一定時間ごとに 90° ずつ回転させ右円偏光と左円偏光を切り替えながら試料を励起し、分子一つ一つの蛍光強度を計測した。その結果、キラリ部位を持たない蛍光分子(ローダミン 101)の場合、右円偏光、左円偏光を切り替えながら測定しても、蛍光強度に大きな変化はなく、ある瞬間に一段階で光退色する単一分子に特有の挙動が観測された(図 3a)。一方、キラリ分子 4 の場合、右円偏光、左円偏光の切り替えに反応して蛍光強度が変化する分子が確認され、この変化量から g 値を求めると、興味深いことに分子集団系の g 値よりもかなり大きな値を示す分子が見出された(図 3b)。

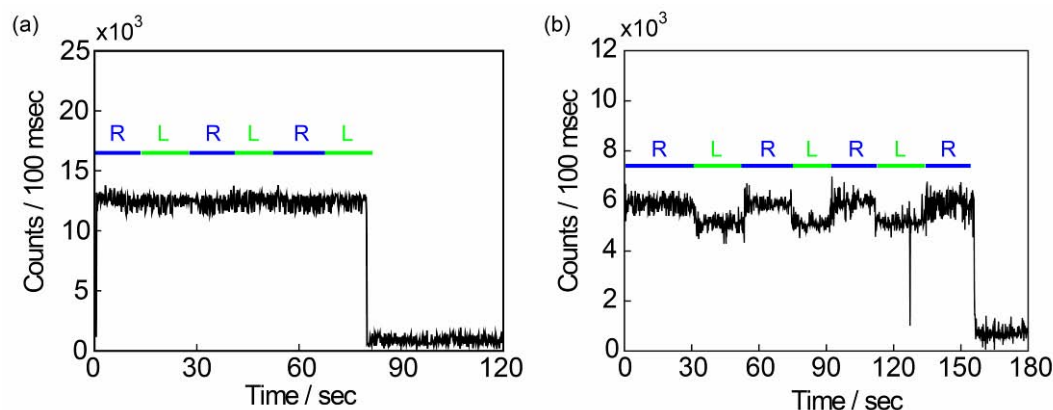


図 3 単一分子 FDCD 計測により得られる、(a)単一アキラリ分子(ローダミン 101)および(b)単一の分子 4 の M 体の蛍光強度の変化; R: 右円偏光励起、L: 左円偏光励起

同様の測定を約 700 個のアキラリ分子およびそれぞれのキラリ異性体に対して行い g 値のヒストグラムを作成した結果、アキラリな分子の場合、ゼロを中心とする幅の狭い分布が確認されたのに対し(図 4、緑のバー)、キラリ分子の場合、分子集団系では一つの負の値として観測される g 値が、同じ構造の分子を見ているにも関わらず分子毎に異なる値を示し、幅広い分布を与えることが見出された(図 4、黒および赤のバー)。また、同一の異性体に対して g 値は正の値も負の値も示すことも認められた。また、それぞれの鏡像異性体から得られる分布の形はほぼ鏡像の関係をとっており、得られるヒストグラムが分子のキラリティーに由来するものであることを示唆する結果が得られた。この結果は、分子集団系の g 値は、 g 値が大小および正負と異なる多数の分子の平均値を観測しているために小さなキラリ応答として観測されるのであり、分子一つ

一つのキラリティーを直接計測すれば、その分子のキラリティーを評価できることを示唆しているものと考えられる。

分子毎に異なる g 値を示し、幅広いヒストグラムを与える原因に対して様々な検討を重ねた結果、分子を分散させる高分子媒体の種類を変えることで、 g 値の分布に顕著な変化が確認された。例えば、Zeonex のようにガラス転移温度: T_g が高い硬い高分子媒体を用いた場合、 g 値の分布は図4に示すように幅広いものになるのに対し、ポリ- n -ブチルメタアクリレート(PnBMA)のように T_g が低い柔らかい高分子媒体を用いた場合には、観測される分布の幅はアキラル分子の時とほとんど変わらなくなり、分子のキラリティーに対する議論はできなくなった。デフォーカスイメージングにより、それぞれの媒体中における分子配向や運動を評価した結果、Zeonex 中ではデフォーカスパターンに変化がなく、分子はその場に固定されていた。一方、PnBMA 中では、デフォーカスパターンが絶えず回転しており、分子はその場で自由に回転していた。従って、分子の配向が分子毎に異なる向きで固定されているような場合には g 値の分布は幅広いものとなり、分子が自由に回転し、その配向が平均化される場合には g 値の分布が狭くなるものと解釈でき、 g 値は分子が光に対してどの向きに配向しているかに強く依存することが示唆された。そのことを明らかにする目的で、単一分子 FDCD 計測とデフォーカスイメージングを同一の分子に対して行い、 g 値と分子配向の相関性を調べた。 z 軸(光の進行方向)に対する分子ダイポールの傾きを θ と定義し、 θ に対する g 値をプロットすると、図5に示すように x - y 平面に対して平行に配向している(θ が大きい)分子は小さな g 値を示し、 x - y 平面に対して垂直に配向している(θ が小さい)分子は比較的大きな g 値を示すという相関性が認められた。これらの実験結果から単一分子 FDCD 計測で観測される g 値の分布は、光に対する分子の配向の違いが大きく起因しているものと結論付けた。

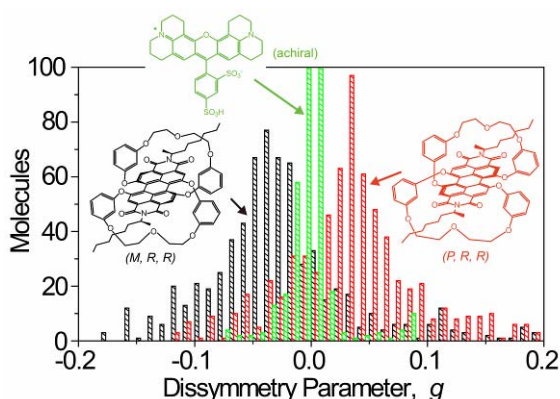


図4 単一分子 FDCD 計測により得られる g 値のヒストグラム;アキラル分子(ローダミン 101):緑 $\langle N=570 \rangle$ 、分子4のM体:黒 $\langle N=594 \rangle$ 、およびP体:赤 $\langle N=613 \rangle$

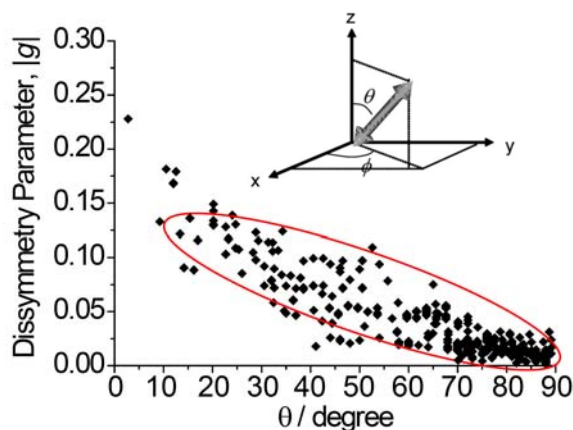


図5 g 値と分子配向 θ の相関性; $\langle N=200 \rangle$

2-4. 単一分子キラリ計測の理論的解析

量子化学計算プログラムGaussian09を用いて、単一分子FDCD計測に用いた分子4の構造最適化を行い、その構造の励起状態計算を実行した。構造最適化の手法は密度汎関数法を用い、このときの汎関数はB3LYP、基底関数は6-31+g(d,p)とした。励起状態計算は時間依存密度汎関数

法を用い、このときの汎関数はB3LYP、基底関数は6-31+g(d,p)とした。基底状態の波動関数と励起状態の波動関数から計算される電気遷移双極子モーメント、磁気遷移双極子モーメントおよび電気遷移四重極子モーメントからrotatory strength tensor: Rを構成し、ランダムに光の進行方向を選び、そのときのg値を計算した。

計算の結果、一方の鏡像異性体であっても光の入射方向の違いにより正のg値も負のg値も示し、光を吸収しにくい向きほどその応答は大きくなり、よく光を吸収する向きではg値は小さくなるという計算結果が得られた。これらの計算結果は、2-3項で示した実験結果とよい一致を示した。これの結果を基に、さらに再安定構造まわりの多数の構造や分子の熱揺らぎも考慮してg値を計算することで、実測で得られるg値を再現する方向に近づくことが認められた。現在、実際の実験環境を計算上においても再現し、分子周りに存在するポリマー分子との相互作用も考慮した計算精度を高めた理論解析に取り組んでいる。なお、この実験は理化学研究所、中村振一郎教授のグループとの共同研究によって行われたものである。

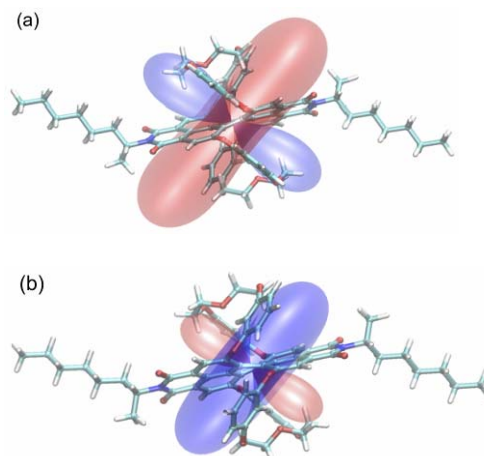


図 6 理論計算により求められる分子 4 の (a)M 体および(b)P 体の最安定構造と g 値の方位依存性; 赤色のローブ: 負の g 値を表す、青色のローブ: 正の g 値を表す

2-5. ラセミ混合物試料に対するキラル計測

従来の多数分子が含まれる分子集団系のキラル計測では、それぞれの鏡像異性体が 1 対 1 の割合で混ざったラセミ混合物の試料からは、それぞれの異性体を示すキラルシグナルが互いに打ち消しあってしまうため、キラル情報を得ることはできない。そのため、各異性体を選択的に合成、もしくは分割する必要がある、通常その過程は多大な労力を要する。しかしながら、単一分子キラル計測では、たとえラセミ体においても、そこに含まれる分子そのものはキラルであり、

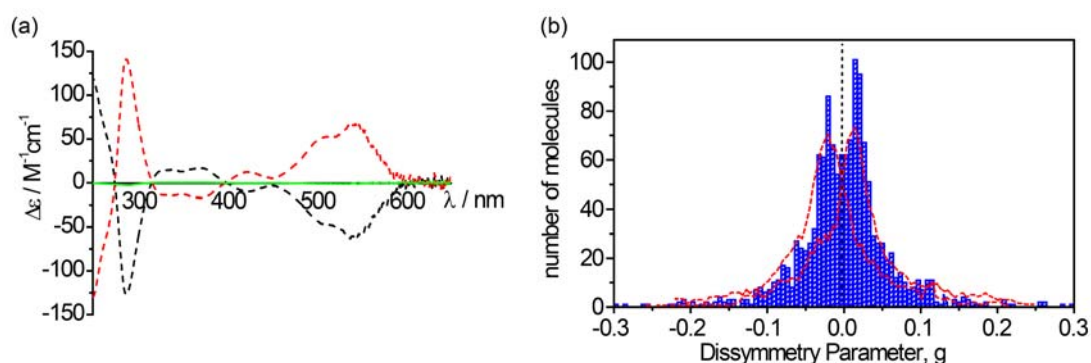


図 7 分子 4 のラセミ混合物試料から得られるキラルシグナル; (a)分子集団系(緑線:ラセミ混合物、赤線:P 体、黒線:M 体)で観測される CD スペクトル(ジエチルエーテル中)、(b)単一分子系で観測される g 値のヒストグラム(赤線:各異性体の測定から得られる g 値の分布曲線) $\langle N = 1227 \rangle$

個々の分子のキラルシグナルを直接計測するため、それぞれの分子の構造に対応したキラル情報を抽出することができるものと期待される。

分子 4 のラセミ混合物の試料に対して分子集団系および単一分子系の両方でキラル計測を行った結果、通常分子集団系ではいかなる CD シグナルも観測されることはなく、分子のキラル応答を議論できない(図 7(a)、緑線)。一方、単一分子系でラセミ混合物の g 値を評価すると、図 7(b)に示すようにその中に含まれる分子は、分子毎に異なるキラル応答を示し、そこから得られる g 値のヒストグラムは、それぞれの異性体から得られるヒストグラムを足し合わせたような分布となることが認められた。この結果は、通常分子集団系の測定ではキラル情報を引き出すことが不可能なラセミ混合物の試料においても、単一分子系ではキラル情報を議論できることを示す結果であり、単一分子キラル計測の発展性を示す結果であると考えられる。

3. 今後の展開

本さきがけ研究により、従来の分子集団系では議論が不可能であった試料に対しても、分子一つ一つを直接観測することで分子のキラリティーを議論できる可能性が見えてきた。今後はこの技術を応用し、光に対して大きなキラル応答が得られる向きに意図的に分子を固定し、すべての分子が大きなキラル応答を示すキラル媒体を作製できれば、極めて高感度かつ微小な単一分子キラルセンサーなどの実現へと研究を進展できるものと期待される。また、本研究で確立した単一分子のキラル応答に関する理論計算を利用し、従来のように合成した後に理論的な取扱いで物性を議論するのではなく、大きなキラル応答を示しうる分子および配向をあらかじめ予測し、その指針を基にキラル分子を設計・合成するという本来の意味で理論計算が実験を先行する形での研究を展開してみたい。その基礎を確立するためには、本さきがけ研究では成し得なかった他の不斉源のキラル分子に対しても単一分子キラル蛍光計測を実現し、この技術の一般性を確立することや、キラル認識能を有するような新しい蛍光性キラル分子を開発することなどが課題となってくる。それらの課題を一つ一つ解決していくことで、究極的な単一分子レベルでのキラル計測技術を普遍的な技術として発展できるものと考えられる。

4. 自己評価

本研究では、キラル計測技術の究極的な到達点ともいえる単一分子レベルでのキラル計測の実現するために、最適な蛍光性キラル分子を合成し、単一分子蛍光計測を応用した単一 FDCCD 計測光学系を構築し、さらに理論計算によって議論を堅固なものとするすることで、分子一つ一つのキラリティーを直接計測・議論することを目指して研究を進めてきた。

研究開始当初は、顕微鏡下でのキラル計測におけるアーティファクトの影響や複数の発色団を有する分子の単一分子蛍光計測における問題点に対する認識が乏しく、単一分子 FDCCD 計測で得られる結果を矛盾なく説明することが難しく、幾度となく分子設計や測定光学系の改善を余儀なくされたため、その部分に研究期間の大半を費やすこととなった。しかしながら、非常に多方面にわたる分野の研究者が集まっている本領域の特色を活かし、それぞれの専門分野の方々からアドバイスを頂き、それらの課題を一つ一つ解決し、最終的に本研究に最適と考えられる蛍光性キラル分子を合成し、考えうるアーティファクトの影響を最大限除いた単一分子 FDCCD 計測系を構築することができたことは評価できる点であると考えている。また、分子一つ一つのキラリティーを直接計測することで、分子はその置かれた環境や配向の違いを顕に反映して、分子毎

に異なるキラル応答を示すことを実験的に捉え、その相関性を明らかとし、これまでの分子集団系で観測される g 値は、大小および正負異なる g 値を持つ多数分子の平均値となるために小さな値として観測されるという化学的な本質を明らかにできた点は、今後の新しいキラル計測技術の確立につながる“さきがけ”的な成果となったのではないかと考えている。理論計算においても、分子の向きはランダムであるという前提に基づいた従来の理論計算ではなく、3次元的な分子の配向まで考慮したキラル応答に対する新しい計算理論を確立できたことも評価できる点であり、今後この計算理論はキラル分子設計に大きく貢献できることを期待している。

本研究の有用性を世間にアピールするためには、具体的な応用例を示すことが重要であるという認識はあったにも関わらず、最適な実験系に辿り着くことができなかつた点が悔やまれる。また、本研究ではらせん軸を不斉源とする分子 4 に対してのみ詳細な単一分子キラル計測を行うことができたが、不斉源の異なる他の分子(1-3)については詳細な議論を行うことには至らなかった。原理的にはこれらの分子に対しても単一分子キラル計測を行うことは可能であると考えられる。引き続き研究を継続し、これらの課題を解決し、「4. 今後の展開」の部分で記載した応用展開に取り組むことで、本さきがけ研究で得られた成果を今後大きく発展させることは十分可能であると考えている。

5. 研究総括の見解

鏡像対称性を持たない鏡像異性体分子の性質をキラルティーと呼ぶ。身近な例として、limonene 分子の一方はレモンの香りで、その鏡像異性体分子はオレンジの香りがする事が知られている。深港研究者は、この分子のキラリティーの起源を化学的アプローチにより解明することにチャレンジした。分子集団で計測すると平均化された値が得られるが、個々の分子を計測すると同一のキラル分子を計測しているにも関わらず、分子毎に大小・正負と異なる幅広い分布をもったキラル応答を示すことを明らかにした。深港研究員は理論計算と合わせてこの結果を解析し、薄膜中の分子の向きに起因することを突き止めている。今後は一分子レベルで制御した分子のキラリティーを基軸に新しい機能開発が可能になるものと期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. T. Fukaminato, “Single-molecule fluorescence photoswitching: Design and synthesis of photoswitchable fluorescent molecules” *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12, 177–208 (2011)
2. T. Fukaminato, T. Doi, M. Tanaka, N. Tamaoki, K. Okuno, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, “Single-molecule Fluorescence Photoswitching of a Diarylethene–Perylenebisimide Dyad: Non-destructive Fluorescence Readout” *Journal of the American Chemical Society*, 133, 4984–4990 (2011)
3. T. Fukaminato, M. Tanaka, T. Doi, N. Tamaoki, T. Katayama, A. Mallick, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, “Fluorescence Photoswitching of a Diarylethene–perylenebisimide Dyad Based on Intramolecular Electron Transfer” *Photochemistry and Photobiological Sciences*, 9, 181–187 (2010) <Most popular top 10 articles in February>
4. T. Fukaminato, T. Doi, M. Tanaka, M. Irie, “Photocyclization Reaction of Diarylethene–Perylenebisimide Dyads upon Irradiation with Visible (> 500 nm) light” *Journal of Physical*

Chemistry C, 113, 11623–11627 (2009)

5. M. Saitoh, T. Fukaminato, M. Irie, “Photochromism of a Diarylethene Derivative in Aqueous Solution Capping with a Water-soluble Nano-cavitand” *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 207, 28–31 (2009)

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

【招待講演】

1. 深港 豪, “フォトクロミック分子を用いた単一分子蛍光の光制御”、第1回光科学異分野横断萌芽研究会、平成23年8月10日、かんぼの宿奈良
2. 深港 豪, “単一分子蛍光の光制御”、レーザー学会学術講演会第31回年次大会:最先端の光の創成を目指したネットワーク研究拠点シンポジウム、平成23年1月10日、電気通信大学

【学会発表(国際)】

1. T. Fukaminato, “Probing the chiral nature by single molecule fluorescence detection”, AS-JST Joint Workshop on Innovative Use of Light and Nano/Bio Materials, May 26, 2011, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
2. T. Fukaminato, K. Shinoda, S. Yokojima, S. Nakamura, M. Irie, “Photocyclization reaction of diarylethene-perylenebisimide dyads upon irradiation with visible (> 500 nm) light”, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 20, 2010, Honolulu, Hawaii
3. T. Fukaminato, T. Doi, M. Tanaka, N. Tamaoki, K. Okuno, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, “Fluorescence photoswitching based on intramolecular electron transfer of diarylethene perylenebisimide dyads”, 6th International Symposium on Organic Photochromism, October 18, 2010, Nisseki Yokohama Hall, Yokohama, Japan
4. T. Fukaminato, M. Irie, “Photoswitching of fluorescence based on diarylethene photochromism”, *New Horizons of Photochromism – From Design of Molecule to Applications –*, October 13, 2008, ARRAS, France

【解説／総説・著書】

1. 深港 豪、入江 正浩: “フォトクロミック分子を用いた単一分子蛍光スイッチ”、*高分子* Vol. 60, pp.74–75 (2011)、(社)高分子学会

研究報告書

研究課題名：「光に依存した新規窒素固定酵素の創成」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：藤田 祐一

1. 研究のねらい

クロロフィル生合成系の最終段階を担う酵素プロトクロロフィリド(Pchlide)還元は、光に依存して反応を触媒する光依存型 Pchlide 還元酵素(LPOR)と光に依存しない暗所作動型 Pchlide 還元酵素(DPOR)の2つの酵素が存在する。LPOR が、短鎖脱水素酵素／還元酵素(SDR)と呼ばれる大きな酵素ファミリーに属するのに対し、DPOR は窒素固定酵素ニトロゲナーゼと構造的な類似性を示す。ニトロゲナーゼは空気中の窒素分子をアンモニアに変換する農業的に大変重要な酵素である。これらの酵素の関係から、LPOR と構造的に類似した光に依存する新規ニトロゲナーゼが創成可能ではないかという着想を得た(図1)。この着想の実現のためには、これら既存の酵素 DPOR、LPOR とニトロゲナーゼの詳細な分子機構の解析が必要である。また、新たな酵素創成のための技術基盤の確立が必要である。

本さきがけでは、DPOR の構造と機能解析、LPOR の機能解析および新たな機能を持つ酵素創成に向けた技術基盤の確立を目指した。

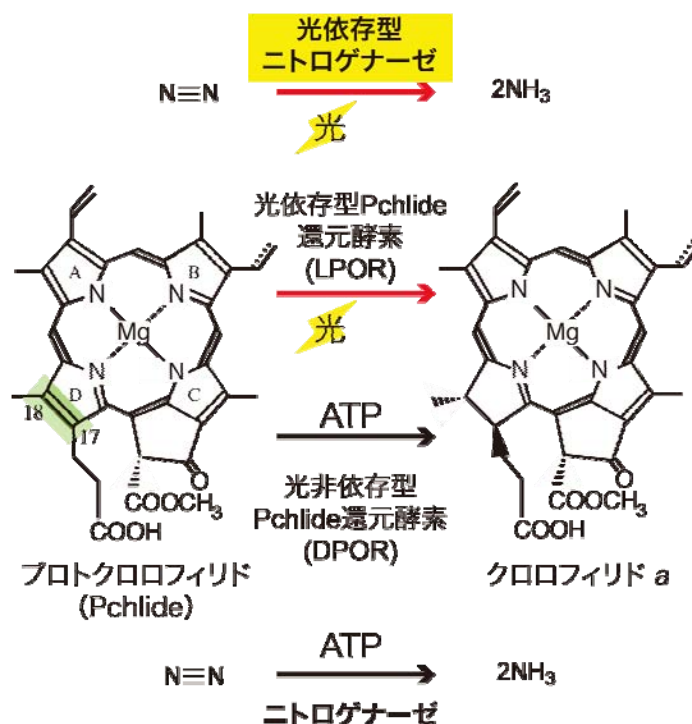


図1、プロトクロロフィリド(Pchlide)還元酵素は、化学的に安定なポルフィリン環の共鳴構造の一部C17=C18二重結合を還元する。Pchlide還元酵素には、ニトロゲナーゼと類似した光非依存型酵素(DPOR)と反応に光を要求する光依存型酵素(LPOR)という2つのアナログ酵素が存在する。これらの酵素の構造と機能に関する詳細な解析に基づいて、「光依存型ニトロゲナーゼ」の創出を目指した。

2. 研究成果

1) 暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素(DPOR)の構造機能解析

(a) NB-タンパク質の構造解析

DPOR は、ATP の加水分解に共役して電子を供給する還元コンポーネント L-タンパク質と Pchlide の還元反応を行う触媒コンポーネントNB-タンパク質から構成されている。本研究では、Pchlide 還元反応機構を明らかにすることを目指し NB-タンパク質に研究の焦点を当てるこ

とにした。X線構造解析により基質結合型のNB-タンパク質の立体構造(2.3 Å分解能)を得た。全体の構造は、生化学的解析によって予測されたように BchN と BchB のヘテロ 4 量体 ((BchN-BchB)₂) であった(図2A)。また、金属分析で予測されていたように [4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターが最小機能単位 BchN-BchB の界面に存在していた。この鉄硫黄クラスターは、3つのシステインと1つのアスパラギン酸によって保持されるユニークなものであったためNB-クラスターと名付けた。また、NB-クラスターから 10 Å の位置に Pchlide 分子が存在していた。構造から機能的に重要と推察されるアミノ酸残基について部位特異的変異導入により変異タンパク質を単離し、活性を評価し、反応機構を以下のように推定した。電子は、NB-クラスターを経由して Pchlide に移され、C17=C18 二重結合還元に供される。この還元に必要な2つのプロトンのうち一つは C17 炭素から下方 4.9 Å の位置の BchB-Asp274 から、もう一つは C18 炭

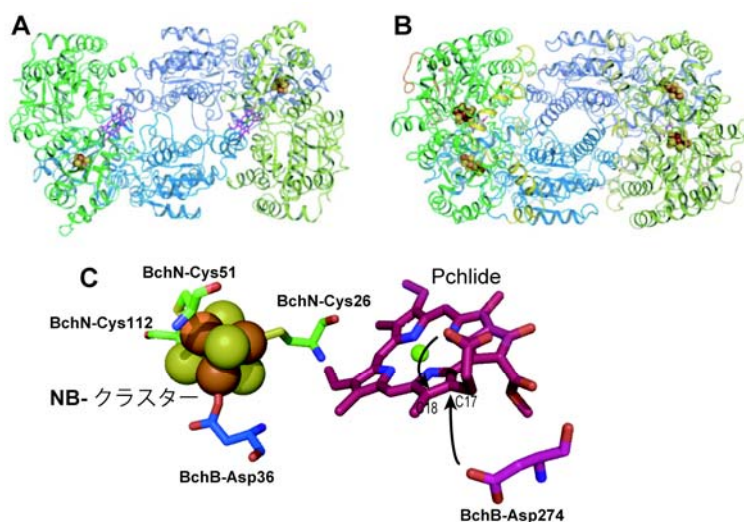


図2、DPORのNB-タンパク質 (A) とニトロゲナーゼMoFe タンパク質 (B) の立体構造比較。全体構造が非常によく保存されている。(C) 構造から予想されるPchlide還元反応の模式図。アスパラギン酸によって保持される鉄硫黄クラスターをもつ酵素は、NB-タンパク質が鉄硫黄酵素として初めての例である。プロトンの供与体は、C17に対してBchB-Asp274、C18に対して基質Pchlideのプロピオン酸と推定され、これらの立体配置が反応の立体特異性を決定づけていると推定される。

素には 4.8 Å 上方に位置する基質自身のプロピオン酸から供給されることで反応の立体特異性が決定していることが推察された(図2C)。この仮説は、BchB-D274A が活性を失うこと、C13 位のプロピオン酸がアクリル酸に置換された Pchlide アナログであるクロロフィル *c* が競合阻害を引き起こすことにより実験的に支持された。

(b)NB-タンパク質の部位特異的変異による機能解析

NB-タンパク質の構造に基づくPchlide 還元の分子機構解明を目指し、部位特異的変異酵素を用いた解析を進めた。NB-クラスターの特徴であるアスパラギン酸配位の意義を検討するため、BchB-Asp36 をシステインに置換した BchB-D36C 変異型 NB-タンパク質のNB-クラスターを電子常磁性共鳴(EPR)により解析した。野生型 NB-タンパク質が L-タンパク質と競合阻害剤クロロフィル *c* の共存下で異常に広い S=3/2 の EPR シグナルを示したのに対し、BchB-D36C 変異型 NB-タンパク質では通常の4つのシステイン残基によって保持される [4Fe-4S]クラスターが示す S=1/2 の EPR シグナルが観測された。また、この変異型 NB-タンパク質は Pchlide 還元活性を失っていた。この結果は、[4Fe-4S]クラスターの配位子の一つをシステインからアスパラギン酸にすることで酸化還元電位が低下し、[4Fe-4S]クラスターが Pchlide 還元への電子供与体として機能することが可能となったことを示唆している。

2)ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた新規酵素選抜系の開発

LPOR は、SDR ファミリーに属する酵素であるが、結晶構造はいまだ明らかにされていない。

構造が解かれた SDR ファミリー酵素から推定された LPOR の構造によると、LPOR ポリペプチドの中央付近に構造が予測できない LPOR 特有のループ構造が存在する。この LPOR 特異的ループが LPOR の光依存的性質の構造基盤を成していると推察される。そこで、LPOR 特異的ループをコードする DNA 領域を新たな DNA 断片に置き換えることで、LPOR を構造鋳型とした新規な光依存的酵素が創出できるのではないかと考えた。このループ配列が LPOR の活性に必須であることを、実際にこのループを削除した短縮型 LPOR を野生型 LPOR と置き換えた変異ラン藻が、LPOR 欠損株 Δpor と同じように光感受性を示すことで確認した。

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム DNA を 200–500 bp に断片化し、エラープローン PCR(epPCR)によって変異をランダムに導入したライブラリーを調製し、このライブラリーで *Synechocystis* sp. PCC 6803 を形質転換し、適切な条件で選抜することで新規酵素をもつ形質転換体を得るという戦略を策定した。そのモデル実験として、実際にライブラリーを調製し、このうち 11 クローンの塩基配列を決定した。平均鎖長は 213 bp であり、エラー導入率は 1 kb 当たり 5 塩基であった。興味深いことに、1 つのクローン(215 bp の挿入)はある遺伝子の相補鎖が翻訳されるようにベクターに連結され、そのアミノ酸配列は *Campyrobacter jejuni* のアスパラギン酸 tRNA シンテターゼと 27% 相同性を示した。この結果は、この方法による新たな酵素創出の可能性を示唆するものである。一方、この方法による新規酵素創出に向けての問題点として次の 2 点が明らかになってきた。1 点目は、epPCR による変異率がそれほど高くなく、もともとゲノム断片に存在する終止コドンに加え、変異導入によって新たに生じる終止コドンを排除することが困難である点である。これらを考慮した上で大腸菌ライブラリーのサイズをできる限り大きくする必要がある。もう一点は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換効率が大腸菌に比べると非常に低いため、いかに大きな大腸菌ライブラリーを調製したとしても、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換の段階でスクリーニングできるクローン数が限定されてしまうことである。

これらの問題点を克服するために新たな戦略を立案した。すでに存在する終止コドンと変異導入によって生じる終止コドンを排除するために、終止コドンを最初から排除したランダムコドンをもつ合成 DNA でライブラリーを調製することを考えた。遺伝暗号表から終止コドンを排除できる 3 種類のランダムコドン NNY、NBB、VNN を考案し、これが連続するようなランダム合成 DNA を利用することにした。これにより終止コドンの完全排除が可能となる。ヌクレオチド合成の技術的問題で、合成可能な一本鎖 DNA は最長 120 mer 程度である。より長いアミノ酸配列をコードできる DNA 断片を得るために、2 本の合成 DNA を、確定配列を介したオーバーラップ PCR によって連結し、213 bp のランダム二本鎖 DNA (両端に 21 bp と中央部に 27 bp の確定配列をもち、前半 72 bp と後半 69 bp のランダムコドン領域をもつ)を得た。実際にこの合成ランダム配列によって得られたクローンの 1 つは、ヒトの骨形成タンパク質-3b の一部と有意な類似性を示した。このことは、終止コドンを排除したランダムコドンをもつ完全合成 DNA が酵素の進化の母集団になりうることを示唆している。

次に、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換効率向上を試みた。エクソヌクレアーゼをコードする *recJ* 遺伝子を欠損した *Synechocystis* sp. PCC 6803 の形質転換効率が非常に高いことが報告されている (Kufryk et al. (2002) *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 215–219)。そこで、実際に *recJ* 変異株を単離し、形質転換効率について野生株と比較した。その結果、*flv3* 遺伝子破壊によりジェンタマイシン耐性を付与する形質転換においては、*recJ* 欠損株は野生株よりも約

1300 倍の形質転換効率が得られた。さらに、*slr2031* 遺伝子の欠損を加えた二重変異株 $\Delta recJ-\Delta slr2031$ では約 1600 倍の効率向上が認められた。この飛躍的に高い形質転換効率は、大腸菌の形質転換効率に匹敵しており、もはや大腸菌でのライブラリー調整を経由することなく、DNA ライブラリーを直接 *Synechocystis* sp. PCC 6803 で選抜することが可能であることを示している。

3. 今後の展開

DPOR の構造と機能解析によって、DPOR は基質を含めた酵素の構造に基づき反応機構を議論できる、クロロフィル生合成系酵素として初めての酵素となった。また、構造は未解明ながら詳細な分光学的解析から反応機構が解析されている LPOR と比較が可能となったことは学術的意義が非常に大きい。また、ニトロゲナーゼでは 8 電子還元が複雑な金属クラスターを経由して進行する非常に複雑な反応であるため、反応機構解析が困難を極めている。これに対し、DPOR では 2 電子還元であり、ニトロゲナーゼ MoFe タンパク質と構造的に酷似していることから、ニトロゲナーゼ反応機構のモデル酵素となることが期待される。また、DPOR のような酸素感受性の高いニトロゲナーゼ類似酵素が葉緑体の中で機能していることを考えると、作物として重要な植物への窒素固定能の付与が原理的に十分可能であることを示唆する研究結果である。

一方で、LPOR 特異的ループを置換することで、SDR ファミリーとしての構造を保持しながら、LPOR 特有の光依存的性質をもつ新たな酵素を創出するというための技術基盤の開発に取り組んだ。ランダムコドンをもつ合成 DNA をもちいたライブラリー調整と *recJ* 欠損株を活用することで、新たな酵素創出に向けて有力な方法を提案することができた。また、*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた選抜系は、これまで大腸菌などの従属栄養生物に限られていた酵素選抜系に光合成生物の系が加わることとなり、新規な光依存型酵素の創出に向け可能性を大きく広げることとなる。

4. 自己評価

DPOR の構造機能解析は、NB-タンパク質の X 線立体構造をもとに部位特異的変異導入や金属中心の解析により、反応機構について具体的な提案を示すことができた。この一連の解析により、光合成を支えるクロロフィルがどのように生合成されているのか、その最終段階の反応に対して初めて構造に基づく反応機構を提案することができた。また、ニトロゲナーゼとの類似性から DPOR がニトロゲナーゼの反応機構解析のモデルになる可能性が新たに拓かれ、これまで国内ではほとんど皆無であったニトロゲナーゼの生化学に対して新たな切り口での取り組みを可能とした。また、作物への窒素固定能移入の可能性に実現性を示す結果であるとして、DPOR の構造解析の論文が引用されたことから周辺分野にも高いインパクトを与えたとと思われる(Beatty and Good, 2011, *Science* **333**, 416-417)。

光に依存した新規ニトロゲナーゼ創成は、容易に可能なことではないが、この大きな目標に対して具体的な方法論の確立を目指してさまざまな試みを行った。その結果、終止コドンを含まないランダムコドンからなる合成 DNA の利用と *Synechocystis* sp. PCC 6803 の高効率形質転換系を確立することができた。特に、高効率形質転換系を利用することで従来のような大腸菌のライブラリー調整を経由することなく、リガーゼで連結した DNA 試料で *Synechocystis* sp. PCC 6803 を直接形質転換するという独自の系を提案することができた。この方法は、光合成

に関連したさまざまなタンパク質や酵素に応用可能であると期待できる。

5. 研究総括の見解

藤田研究者は、光依存型プロトクロロフィリド還元酵素 (DPOR) と窒素を還元してアンモニアにする酵素 (ニトロゲナーゼ) との間に構造的な類似性を発見した。本研究では、この光依存型酵素 (LPOR) をモデルとして、光依存的にアンモニアを合成する新規の酵素の創出を目指した。その研究過程で、DPOR の立体構造を X 線解析法により世界で初めて決定し、ニトロゲナーゼとの構造的な類似・相違を解析し、目的の酵素を創出するストラテジーを提案した。そして、LPOR をテンプレートにして網羅的変異導入の手法により、目的の酵素の創出を試みている。研究期間内に目的酵素の創出までには至っていないが、立体構造を基礎として両還元酵素の作用機作についての新知見を発見した。藤田研究者のこの努力が、農学関連研究者に光技術のインパクトを理解してもらおうきっかけを作り、さらに新しい研究アプローチとして定着していくことを祈っている。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文 (原著論文) 発表

1. Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R. and Fujita, Y. Functional evaluation of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase encoded by the chloroplast DNA of *Physcomitrella patens* in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1983–1993, 2011
2. Aoki, R., Goto, T. and Fujita, Y. A heme oxygenase isoform is essential for aerobic growth in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Modes of differential operation of two isoforms/enzymes to adapt low oxygen environments in cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1744–1756, 2011
3. Kondo, T., Nomata, J., Fujita, Y. and Itoh, S. EPR study of 1Asp–3Cys ligated 4Fe–4S iron–sulfur cluster in NB–protein (BchN–BchB) of a dark–operative protochlorophyllide reductase complex. *FEBS Letters*, **585**, 214–218, 2011
4. Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G. and Fujita, Y. X-ray crystal structure of the light–independent protochlorophyllide reductase. *Nature* **465**, 110–114, 2010
5. Yamamoto, H., Kurumiya S., Ohashi, R. and Fujita, Y. Oxygen sensitivity of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1663–1673, 2009

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物等)

<国際学会招待講演> [下記の他、国際学会 11 件、国内学会 46 件]

- 1 Yuichi Fujita, Toward understanding of reaction mechanism of dark-operative protochlorophyllide reductase. International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic organisms, July 24–28, 2011, Berlin, Germany

- 2 Yuichi Fujita, Structure-based functional analysis on dark-operative protochlorophyllide reductase. Gordon Research Conference, Photosynthesis, June 12-17, 2011, Davidson College, Davidson, NC, USA
- 3 Yuichi Fujita, Creation of a new light-dependent nitrogenase. AS-JST Joint Workshop on Innovative Use of Light and Nano/Bio Materials, May 26-27, 2011, Taipei, Taiwan
- 4 Yuichi Fujita, Norifumi Muraki, Jiro Nomata and Genji Kurisu, Structure of dark-operative protochlorophyllide reductase: a greening mechanism with an architecture common to nitrogenase. Nagoya University GCOE/Structural Biology Center International Symposium, November 23-24, 2010, Nagoya, Japan
- 5 Yuichi Fujita, Norifumi Muraki, Jiro Nomata and Genji Kurisu, A common architecture between protochlorophyllide reductase and nitrogenase. 1st Asian Symposium on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, September 20-24, 2010, Miyazaki, Japan
- 6 Yuichi Fujita, Norifumi Muraki, Jiro Nomata and Genji Kurisu, Structure of the light-independent protochlorophyllide reductase reveals architecture common to nitrogenase. 9th European Conference on Nitrogen Fixation, September 6-10, 2010, Geneva, Switzerland
- 7 Yuichi Fujita, Genji Kurisu, Norifumi Muraki and Jiro Nomata, Structural aspects of dark-operative protochlorophyllide reductase with nitrogenase-like features. 6th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, July 4-9, 2010, Santa Ana Pueblo, NM, USA
- 8 Yuichi Fujita, Structural basis of nitrogenase-like dark-operative protochlorophyllide reductase catalyzing porphyrin reduction. 16th International Conference on Nitrogen Fixation, June 14-19, 2009, Big Sky, Montana, USA
- 9 Yuichi Fujita, Structural aspects of dark-operative protochlorophyllide reductase. International Symposium on Chemistry of Reductases II, January 15-16, 2009, Nagoya, Japan

<総説>

- 1 藤田祐一 暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素～ニトロゲナーゼとの構造的類似性から見る酵素の多様性と進化～ *生化学* **83**, 642-647, 2011
- 2 村木則文、栗栖源嗣、野亦次郎、藤田祐一 クロロフィル生合成系酵素と窒素固定酵素の共通構造基盤 *日本結晶学会誌* **53**, 113-118, 2011
- 3 藤田祐一、栗栖源嗣 クロロフィルを緑にする2つの還元酵素：光依存型酵素と暗所作動型酵素の反応機構と進化的考察 *生物物理* **51**, 66-71, 2011
- 4 Reinbothe, C., El Bakkouri, M., Buhr, F., Muraki, N., Nomata, J., Kurisu, G., Fujita,

Y. and Reinbothe, S. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends in Plant Sciences* **15**, 614-624, 2010 (表紙を飾りました)

- 5 小俣達男、藤田祐一、前田真一 光合成微生物は資源・エネルギー分野で人類に貢献できるか?〜生産性を規定する諸要因の分析〜 *光合成研究* **20**, 65-71, 2010

<著書>

1. 藤田祐一、野亦次郎 (2009) 光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* における大量発現と形質転換「光合成研究法」低温科学 67 巻、pp. 648-652、北海道大学低温科学研究所
2. 藤田祐一、野亦次郎 (2009) 嫌気条件下でのタンパク質精製「光合成研究法」低温科学 67 巻、pp. 423-427、北海道大学低温科学研究所