

業績紹介：振動和周波赤外超解像顕微鏡法を用いた A549 培養細胞の赤外分光イメージング

井上圭一 (東工大資源研・計画研究連携者)
藤井正明 (東工大資源研・計画研究代表者)
酒井 誠 (東工大資源研・計画研究分担者)
論文題目：“Infrared imaging of an A549 cultured cell by a vibrational sum-frequency generation detected infrared super-resolution microscope”
著者：S. Kogure, K. Inoue, T. Ohmori, M. Ishihara, M. Kikuchi, M. Fujii, M. Sakai,
雑誌：Optics Express, **18**, 13402-13406 (2010).

生体関連分子の構造解析において、ラマン散乱と相補的な振動情報が得られ、特に官能基の振動モードに鋭敏な赤外分光を用いた赤外顕微鏡は極めて有用であると考えられる。しかし、通常の赤外顕微鏡では、回折限界の制限により空間分解能を数 μm より小さくすることが出来ない。我々は、赤外吸収を可視発光に変換する特徴をもつ過渡蛍光検出赤外分光法あるいは振動和周波発生 (VSFG) 法を顕微鏡技術に適用することで、空間分解能がサブマイクロメートルまで達する赤外超解像顕微鏡の開発を行い、細胞観察に利用している【1】。本論文では、近年、生物や医療の分野で急速に需要が高まっている生きたままの細胞観察に VSFG 検出赤外超解像顕微鏡法を適用した。試料にはヒト肺癌由来の培養がん細胞 (A549 細胞) を用いた。

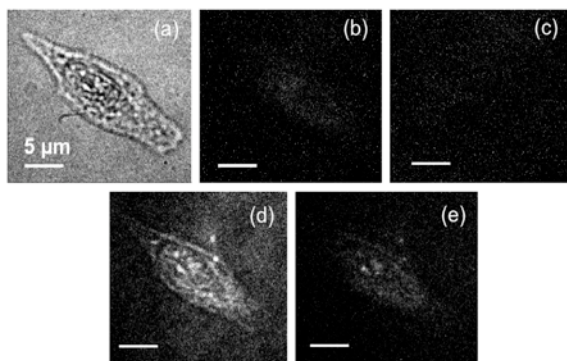


Fig. 1 A549 細胞の VSFG イメージング

Fig. 1 に A549 細胞の VSFG イメージングを示す。(a) は A549 細胞の透過像であり、この細胞に VSFG 赤外超解像顕微鏡法を適用した。入射光はそれぞれ、(b)

可視光 (610 nm)、(c)赤外光 (3055 cm^{-1})、(d) 可視光+赤外光 (3055 cm^{-1})、(e) 可視光+赤外光 (2728 cm^{-1}) のイメージングである。可視光のみ、あるいは赤外光のみでは発光が観測されていないのに対し、両者を入射した場合は細胞から非常に強い発光が観測されていることがわかる。さらに、赤外光の振動数を 3055 cm^{-1} から 2728 cm^{-1} へ変えたところ、赤外振動数に依存して発光強度が大幅に減少した。そこで、様々な赤外振動数において A549 培養細胞の赤外イメージング測定を行った。結果を Fig. 2 に示す。赤外振動数は(a) 3150 cm^{-1} 、(b) 3055 cm^{-1} 、(c) 2925 cm^{-1} 、(d) 2803 cm^{-1} を用いた。

(a)、(b)は、芳香族の CH 伸縮振動に対応する赤外振動数を入射したものであり、細胞内に分布する核酸塩基やタンパク質の赤外吸収を反映している

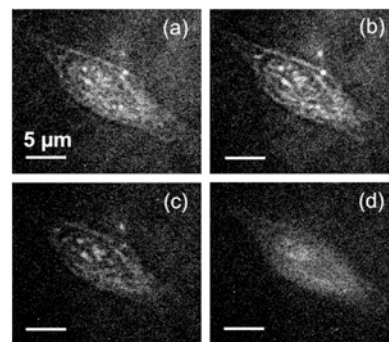


Fig. 2 A549 細胞の VSFG 像の赤外波長依存性

と考えられる。また、(c)と(d)は、脂肪族の CH 伸縮振動に対応する赤外振動数を入射したものであり、細胞膜の脂質のアルキル鎖の赤外吸収を反映していると考えられる。加えて、(d)では、はっきりとした細胞の内部構造が観測されていない。これは、単純に脂質が分散されているのではなく、細胞の生命力低下に伴い、核膜やミトコンドリアといった細胞内の膜構造が崩壊していく過程を観測している可能性が考えられる。

以上のように、VSFG 検出赤外超解像顕微鏡法は生きたままの細胞観察に十分適用可能であり、さらには、細胞の生命現象をも観察する可能性を秘めている。今後、生細胞観察の重要ツールとなることが期待される。

【引用文献】

【1】 K. Inoue, M. Fujii, M. Sakai, *Appl. Spectrosc.* **64**, 275-281 (2010) など.

業績紹介：プロトンの長距離移動反応における水分子の触媒作用

松田欣之 (東北大院理・計画研究連携者)
藤井朱鳥 (東北大院理・計画研究代表者)
論文題目: "Catalytic action of a single water molecule in a proton-migration reaction"

著者: Yoshiyuki Matsuda, Ayako Yamada, Ken-ichi Hanaue, Naohiko Mikami, and Asuka Fujii

雑誌巻号: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 4898-4901 (2010)

ニュースレター2009年4月号で紹介した真空紫外(VUV)光イオン化検出赤外分光法により、VUV光イオン化過程における前駆体(中性クラスター)と生成物(クラスター正イオン)それぞれのサイズ選別赤外分光研究が可能となった。[1] これまで同分光法はプロトン性分子クラスターのイオン化ダイナミクス研究に応用され、それらのイオン化過程において、親水基間のプロトン移動が起こることが明らかになってきた。

本研究では、光イオン化によって誘起される異性化反応における溶質-溶媒間の相互作用について知見を得ることを目的として、同分光法によるアセトン-水クラスターのイオン化ダイナミクス研究を行なった。

図1は、アセトン-水クラスター正イオンの赤外スペクトルと量子化学計算による最適化構造と基準振動の比較である。実測のスペクトルと振動計算の対応により、アセトン-水クラスター正イオンは、最も安定な構造であるアセトンのエノール型正イオンと水分子が水素結合した構造(図中の Structures I & II)を形成していることがわかった。この結果は、アセトン-水クラスターのイオン化において、アセトンがエノール型へ互変異性化していることを示している。

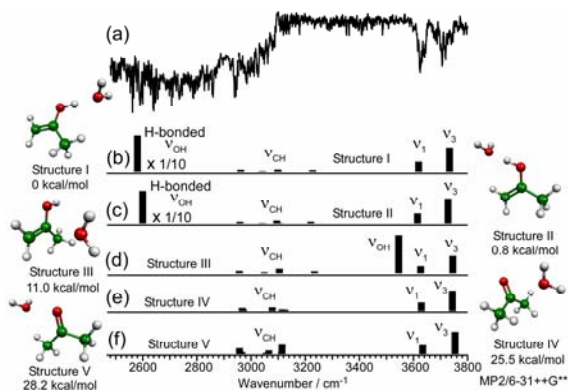


図1 アセトン-水クラスター正イオンの赤外スペクトルとMP2/6-31++G**レベルにおける安定構造と基準振動計算結果

中性および正イオンのアセトン-水クラスターとその重置換体の赤外分光研究の結果、アセトン-水クラスターの光イオン化において、図2に示す反応プロセスによって、アセトン正イオンが互変異性化することがわかった。中性のアセトン-水クラスターのイオン化後、水分子がアセトン正イオンのメチル基のプロトンを引き抜き、同じプロトンカルボニル酸素へ渡す。このように、水分子がプロトンの長距離移動に対し catch & release 型の触媒作用することにより、アセトン正イオンがエノール型へと互変異性化する。この結果は、プロトン移動反応における水分子の catch & release 型の触媒作用を実験的に明らかにしたはじめての例である。

またこれまで、イオン化過程における OH や NH などの親水基間のプロトン移動については数多くの議論がなされてきたが、アルキル基からのプロトン移動を分光学的に明らかにした例はほとんどない。本研究により、イオン化過程において疎水基であるメチル基からのプロトン移動が起こることが分光学的に示された。

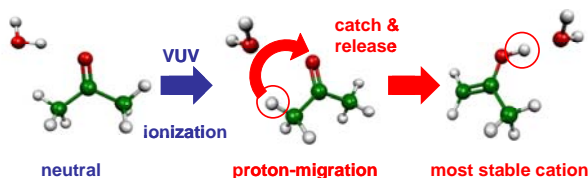
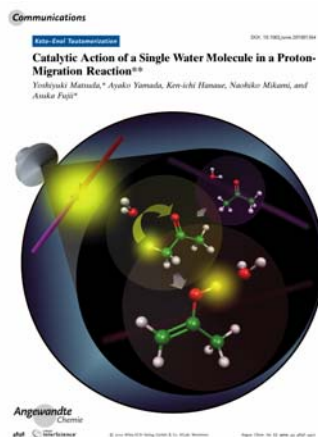


図2 アセトン水クラスターの光イオン化過程における異性化反応ダイナミクス

本論文は、*Angew. Chem. Int. Ed.*誌に掲載され、雑誌の中表紙に選ばれた。



[1] Matsuda et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 1279 (2009).

業績紹介：視覚における熱雑音の起源と分子機構の解明

古谷祐詞 (分子研・公募研究代表者)
神取秀樹 (名工大院工・班友)

論文題目: "Protein Fluctuations as the Possible Origin of the Thermal Activation of Rod Photoreceptors in the Dark"
著者: Víctor A. Lórenz-Fonfría, Yuji Furutani, Toru Ota, Kazutomo Ido, and Hideki Kandori
雑誌巻号: *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5693-5703 (2010)

網膜にある桿体視細胞は高感度な光センサーであり、星明かりでも光を感知できる。視細胞がたった1つの光子にも電気応答できることが生理的な基盤となっており、視細胞内に存在する $\sim 10^9$ 分子のロドプシンが光を受容する。光はロドプシン内部に結合した 11-*cis* 型レチナールにより吸収され、*all-trans* 型へと異性化することで蛋白質構造が活性化型に変化し、細胞内のシグナル伝達系を駆動して、電気応答を示す。暗中でロドプシンが勝手に活性化しないように 11-*cis* 型レチナールはインバーサゴニストとしてもはたらき、不活性化状態に構造を安定化している。しかしながら、電気生理実験により、光がなくても細胞が電気応答する Dark Event という現象が報告されており、その応答は光刺激と識別できないことから、ロドプシンが熱的に活性化されることに由来すると考えられている。電気生理実験によると、その活性化エンタルピーと速度定数はそれぞれ 80-110 kJ/mol と 10^{-11} s^{-1} (36°C)である。光異性化反応の初期中間体バソロドプシンが熱的に生成するとすれば、それぞれの値は $\geq 180 \text{ kJ/mol}$ と $\leq 10^{-19} \text{ s}^{-1}$ と見積もられ、電気生理実験での値とは大きな隔たりがあり、ロドプシンの熱的活性化の起源や分子機構は不明のままであった。

本研究では、NMR で蛋白質のダイナミクスを定量的に解析する手法として定評のある重水素交換(H/D 交換)反応解析を、光誘起差 FT-IR 分光法を巧みに利用

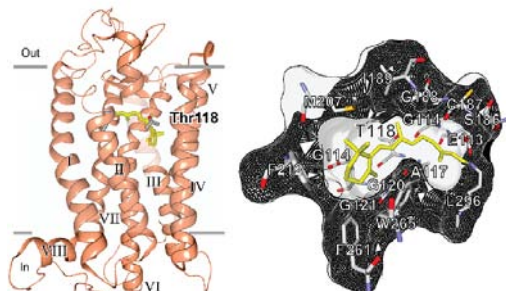


図1 ウシロドプシンの結晶構造

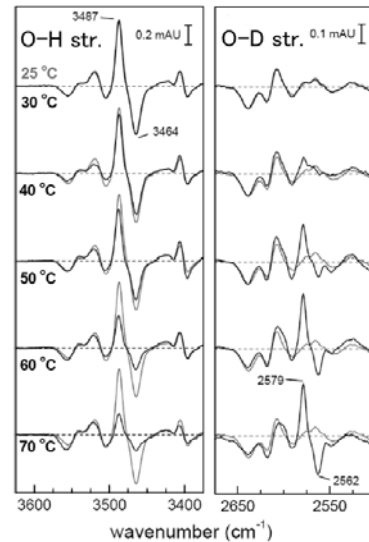


図2 Thr118 の OH, OD 伸縮振動

することでウシロドプシンのレチナール結合部位 (RBP)に存在する Thr118 の OH 基に対して適用した。Thr118 は、図 1 に示したように外部から隔離されているため、H/D 交換反応が起こるには、蛋白質構造が Open-Closed 間で熱的に揺らぐことにより、Thr118 の近傍に水分子が接近する必要がある。このように、Thr118 は蛋白質の構造ダイナミクスを解析するのに適した天然のプロープと考えられる。様々な温度で H/D 交換反応をし、その後、77 K での光照射によってバソロドプシンとの赤外差スペクトルを計測し、Thr118 の OH および OD 伸縮振動バンドの強度変化を解析した(図 2)。蛋白質構造の揺らぎを定量的に評価することで、ロドプシンの熱的活性化エンタルピーは $95 \pm 16 \text{ kJ/mol}$ と見積もられ、その速度定数は $\sim 10^{-12} \text{ s}^{-1}$ (36 °C)となり、これまでの実験値を上手く再現した。

余談：本研究は最初から狙って行ったものではなく、ウシロドプシンのシッフ塩基近傍に存在する内部結合水のバンド帰属^[1]を検証する中で得られたものである。強い水素結合のために、 ^{18}O 水に置換しないバンドがあるのではないかと批判に応えるための実験であった。実際には新たに同位体シフトを示す水分子のバンドは観測されず、代わりに Thr118 の OH 基が H/D 交換するという意外な結果を得た。強力な共同研究者のおかげで面白い研究成果に繋がったことに望外の喜びを感じている。この場を借りて御礼申し上げる。

[1] Y. Furutani et al., *Biochemistry* **42**, 9619-9625 (2003).

業績紹介：第一原理経路積分ハイブリッドモンテカルロ法の開発 およびフッ化物イオン水和クラスターにおける核の量子効果の重要性

立川 仁典 (横浜市立大院・公募研究代表者)

論文題目: "Efficient *ab initio* path integral hybrid Monte Carlo based on the fourth-order Trotter expansion: Application to fluoride ion-water clusters"

著者: K. Suzuki, M. Tachikawa, and M. Shiga

雑誌巻号: *J. Chem. Phys.*, **132**, 144108 (2010)

イオン性水素結合は典型的な水素結合に比べ強い相互作用を有しており、イオンの水和現象において重要な役割を果たしている。イオン性水素結合構造を従来の第一原理計算だけで求める場合、実験で示唆された構造を定性的にも再現することが困難な場合がある[1]。これは、イオン性水素結合系は量子揺らぎと熱揺らぎが複雑に絡むことによって、構造に大きな影響を与えるためである。我々のグループでは、量子および熱揺らぎを精度よく第一原理計算に取り入れることができる、第一原理経路積分法、その中でも高精度に量子揺らぎを考慮できる4次のTrotter展開による経路積分シミュレーション法の開発および応用計算を行っている。

本報告では、第一原理経路積分ハイブリッドモンテカルロ (PIHMC)法を開発し、フッ化物イオン水和クラスターとその重水素置換体に適用した例を示す。以降、簡便のためPIHMCによるH体とD体を“量子核H体”および“量子核D体”、核を古典的に扱ったものを“古典核”と表記する。

精度よく量子および熱揺らぎを考慮する方法として4次の第一原理経路積分分子動力学法が広く用いられているが、ステップ毎にポテンシャルの2階微分を求める必要があるため実用的ではない。そこで、我々はハイブリッドモンテカルロ(HMC)法に注目した。HMC法では試行配置生成と採択・棄却の二つの過程からなっており、それぞれの過程で異なるポテンシャルの精度を用いることができる。我々の手法では、試行配置生成に2次の核に働く力を用い、採択・棄却に4次の有効ポテンシャルを用いることにより計算コストをポテンシャルとその1階微分までに抑えている。

図1に、300 Kにおけるフッ化物イオン水和クラスターのスナップショットを示す。 $\langle R_{OH^*} \rangle$ の期待値は、 $\langle R_{OH^*} \rangle_{(古典核)} < \langle R_{OD^*} \rangle_{(量子核)} < \langle R_{OH^*} \rangle_{(量子核)}$ の傾向が得られ

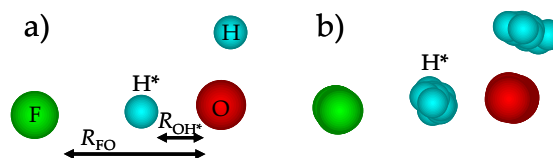


図1. $F^-(H_2O)$, 300 K のスナップショット。

a) 古典核、b) 量子核 H 体

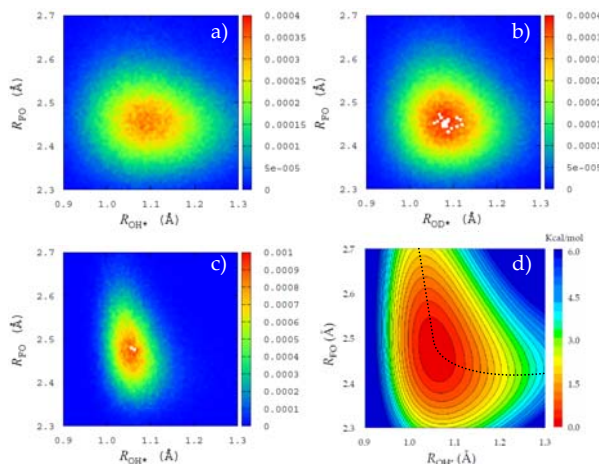


図2. R_{FO} vs R_{OH^*} の二次元分布図 a) 量子核 H 体、b) 量子核 D 体、c) 古典核、および d) ポテンシャル曲面

た。この傾向はポテンシャルの非調和性における零点振動の違いが大きな寄与として現れたためである。それに対して骨格構造 R_{FO} は、 $\langle R_{FO} \rangle_{(古典核)} > \langle R_{FO} \rangle_{(量子核 D)}$ > $\langle R_{FO} \rangle_{(量子核 H)}$ となり、 R_{OH^*} の傾向とは逆の結果が得られた。そこで我々は、図2に二次元分布とポテンシャルエネルギー曲面の解析を行った。図2c)とd)を比較すると、古典核の分布はポテンシャルの深い領域に沿って分布していることが分かる。一方、特に $R_{OH^*} > 1.1 \text{ \AA}$, $R_{FO} < 2.6 \text{ \AA}$ の領域では、量子核の分布は古典核よりも大きくなっている。これは量子核の場合では $FH \cdots OH^-$ 構造を取りやすいことを意味する。

最後に、プロトン移動の割合について算出した。プロトン移動座標(R_{PT})は、以下のように定義する。

$$R_{PT} = (R_{OH^*} - R_{OH^0}) - (R_{FH^*} - R_{FH^0})$$

ここで、 R_{OH^0} と R_{FH^0} は孤立系の水およびHF分子の距離を示す。分布関数から $R_{PT} > 0$ の値を積分したところ、古典核、量子核 D 体、量子核 H 体に対して、それぞれ 0.3%, 4.9%, および 9.4%であった。核の量子効果を高精度に考慮することによって古典核に比べ量子核は $FH \cdots OH^-$ 構造を取り易い結果が得られた。

[1] M. Tachikawa and M. Shiga, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11908 (2005).

業績紹介：ハロゲン結合形成による赤外強度増大の機構を定量的に解明

鳥居 肇 (静岡大教育・公募研究代表者)

論文題目: "Intermolecular charge flux as the origin of infrared intensity enhancement upon halogen-bond formation of the peptide group"

著者: Hajime Torii

雑誌巻号: *J. Chem. Phys.* **133**, 034504 (2010)

化合物中においてハロゲン原子は、多くの場合、その電気陰性度の高さのために、平均的に負電荷を持つが、他分子の負電荷を持つ原子 (C=O基の酸素など) と、しばしば引力的に相互作用することが知られている。これは、ハロゲン結合と呼ばれ、水素結合と比較して論じられることが多い。平均的に負電荷を持つ原子が、他分子の負電荷を持つ原子と、どうして引力的に相互作用することができるか? その機構については、文献[1]で論じたが、原子価殻の p_x^2, p_y^2, p_z^2 電子配置 (結合方向を z 軸とする) が本来的に持つ原子内の異方的な電荷分布により、結合の延長線上に外向きの電場が生成することに由来している。そして、その異方的な電荷分布は、ハロゲン原子上の電気四重極子により、的確に表現できる[2]。

ハロゲン原子を持つ化合物が、蛋白質の阻害剤として働くケースなどにおいては、蛋白質主鎖のC=O基へのハロゲン結合 (C-X...O=C) が見られる。ここで興味を持たれるのは、ペプチド基 (O=C-N-H) 特有の振動モードへの影響である。よく知られているように、ペプチド基は幾つか特徴的な振動モードを持っており、蛋白質の構造 (特に 2 次構造) や相互作用 (例えば溶媒水分子との水素結合) のプローブとして用いられている。そこで、水素結合と比較して、ハロゲン結合がどのような影響を持つかを、定量的に解析することは、重要である。そこで、ペプチド基のモデル分子としてよく用いられる N -メチルアセトアミド (ここでは重水素化したNMA- d_1) とハロゲン原子を持つ幾つかの化合物が形成する会合体を対象に、この点について解析を行った。

まずNMA- d_1 とBr₂のO...Br会合体を対象とした計算から、アミド I' モードの低振動数シフト (約-52 cm⁻¹) と赤外強度増大 (約+520 km mol⁻¹ 或いは 2.6 倍) が、ハロゲン結合形成に特徴的な変化として見出された。アミドII' モードとND面外変角モードの高振動数シフ

とも、ハロゲン結合形成に伴って起こるが、これはNMA- d_1 とD₂O 1 分子の水素結合形成による変化と同程度であった。そこで、ハロゲン原子を持つ幾つかの化合物との会合体について、アミド I' モードの振動数と赤外強度の変化を計算し、水との会合体と比較したところ、アミド I' モードの振動数とC=O結合長の変化の間の相関は、ハロゲン結合系と水素結合系でほぼ共通であったが、アミド I' モードの赤外強度の増大は、水素結合系と比較してハロゲン結合系の方が顕著であることが見出された。

NMA- d_1 ...Br₂会合体のアミド I' モードによる電子密度の変化 (電子密度微分, $\partial\rho^{(el)}(r)/\partial Q_{\text{amI}}$) のハロゲン結合形成による変化を、2次元マップとして図1上側に示す。アミド I' モードはNMA- d_1 分子に局在しているが、電子密度の変化はBr₂分子にまで広がっている。積分値の1次元プロット (図1下側) から、C=Oが伸びるにしたがってBr₂分子に電子が移動することがわかる。この結果は、ハロゲン結合系におけるアミド I' モードの赤外強度増大の機構として、分子間の電荷フラックスが重要であることを示す。さらに、赤外強度の解析が、分子会合体における分子配置に関する有用な知見を与えることを示唆する。

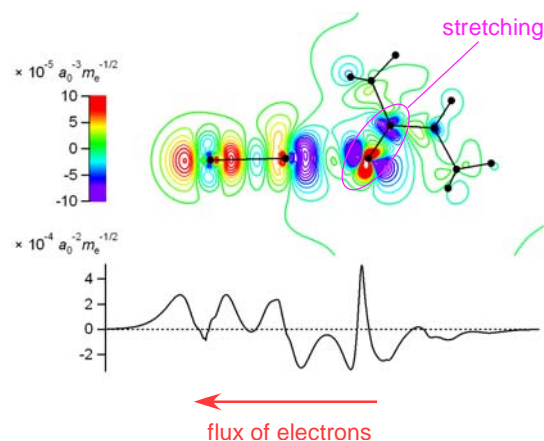


図1. NMA- d_1 ...Br₂会合体のアミド I' モードによる電子密度の変化 (電子密度微分)

引用文献

[1] H. Torii and M. Yoshida, *J. Comput. Chem.* **31**, 107-116 (2010).

[2] H. Torii, *J. Chem. Phys.* **119**, 2192-2198 (2003).