

分光型光電子・低エネルギー電子顕微鏡 (SPELEEM) による In/Cu (001) 表面の相転移の実空間観察

理学研究科化学専攻 代表者 八田 振一郎



本プロジェクトでは、結晶表面において起こる相転移などのダイナミクスを実空間観察し、ドメインの成長や融解などについてメソスコピックスケール (nm– μ m) での研究を行うことを目的としている。その第一段階として、表面の電荷密度波 (CDW) 相転移に伴う秩序形成に注目した。

実験に使用した装置は分光型光電子・低エネルギー電子顕微鏡 (Spectroscopic Photoemission and Low-energy Eletron Microscope : SPELEEM) である。本装置は、仕事関数以上のエネルギーを持った光または低速電子を照射することにより表面から放出または散乱されてくる電子を拡大投影することにより、50 nm 程度の空間分解能で表面の実空間観察を可能にする。さらに、ビデオレートでの観察により数 10–100 msec 程度の時間分解を得ることができる。またエネルギー分析器が設置されているため、光電子分光法による電子状態の分析も行うことができる。つまり、本装置は空間・時間・エネルギーについて表面の状態分析が行えるため、構造と電子状態が密接に関連した現象である相転移の研究に非常に有効であると考えられる。

In/Cu (001) 表面の LEEM 観察

結晶表面に入射した低速電子の一部は表面のポテンシャルによって弾性散乱され、回折波を形成する。これを投影したものが低速電子回折 (Low-energy electron diffraction : LEED) パターンである。一つの回折波を選択し結像させた場合、その回折波に対応するドメインが明るく表示され、それ以外の領域は暗く表示される。このように回折波を選択して得られる像を「低速電子顕微鏡 (Low-energy electron microscope : LEEM) ・暗視野像」と呼ぶ。

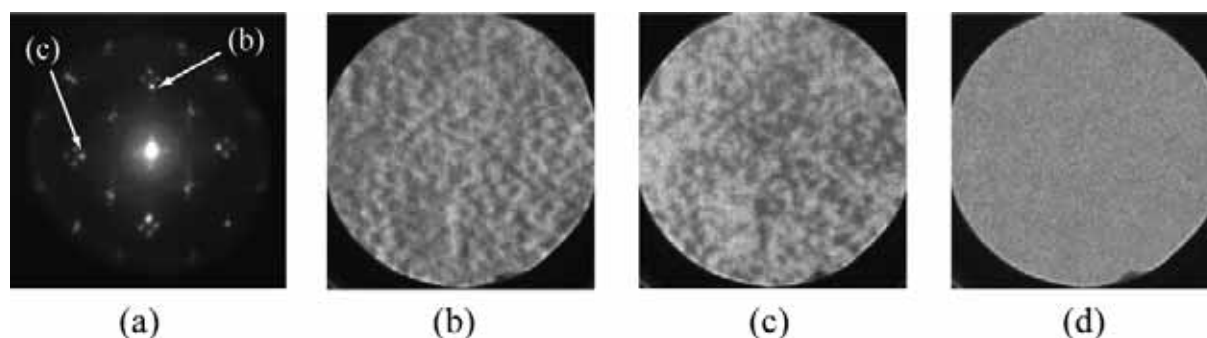


図1 (a) In/Cu (001) ($\Theta = 0.5$ ML) における LT 相の LEED パターン。(b)、(c) 直行するドメインからの LEEM ・暗視野像。それぞれに対応する回折波を (a) において矢印で示唆している。(d) LT 相において (b) の視野を転移温度より高い温度 (~ 360 K) まで加熱した時の LEEM ・暗視野像。

In/Cu (001) 表面では、In の被覆率が 0.5 原子層分の場合、室温では Cu (001) 表面の単位格子を (1×1) と表記して、 $(9\sqrt{2} \times 2\sqrt{2}) R45^\circ$ (LT 相) という長周期の変調構造が形成される。この表面を約 350 K に加熱すると、可逆的な相転移が起こり、表面周期構造は $(\sqrt{2} \times \sqrt{2}) R45^\circ$ (HT 相) へと変化する。転移に伴い表面状態のフェルミ面が消失し、ギャップが形成されることから表面 CDW 相が形成されていると考えられている。図 1 (a) が LT 相から得られる LEED パターンである。小さな十字を記すように並ぶ細かい回折パターンが LT 相の構造に由来するスポットであり、その縦の並びと横の並びはそれぞれ直交する 2 つのドメインからの回折波による。

図 1 (b) および (c) は、(a) において示した 2 つの回折波を結像して得られた暗視野像である。視野の大きさは $5 \mu\text{m}$ である。2 枚の像のコントラストが反転していることから、この表面が互いに直交するドメインによって均一に覆われた状態にあることが分かる。また、ドメインの空間パターンはおよそ 300 nm 程度のサイズを持つことが分かった。

相転移に関する実験では、図 1 (b) の暗視野像を観察しながら試料の加熱・冷却を行った。加熱により像のコントラストは弱まり、360 K 付近においては均一な図 1 (d) のような像が得られた。この後、試料を自然冷却し、再びコントラストが現れるまでを記録した。その結果、ドメインの空間パターンは相転移の前後において同一ではないことが分かった。このことは、LT 相において観察された空間パターンは、基板のステップや結晶欠陥によって固定されたものではなく、LT 相が形成される過程において生じる秩序ゆらぎが保存されたものであることを示している。

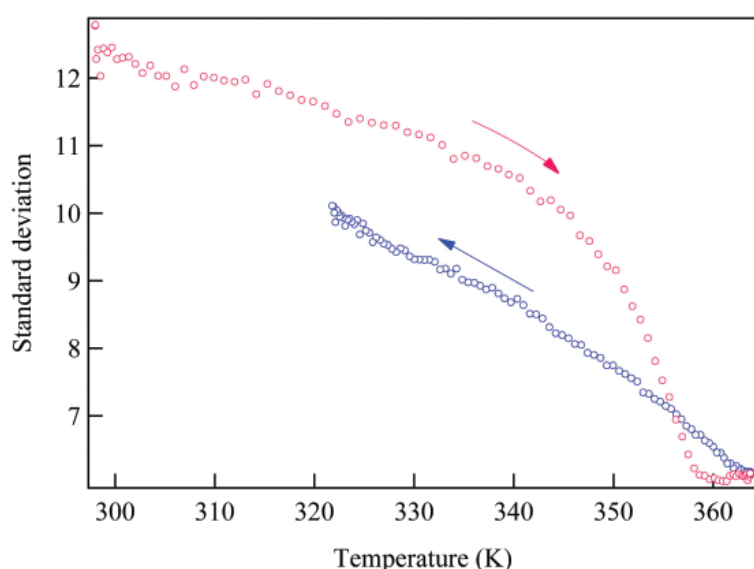


図 2 暗視野像におけるピクセル強度の標準偏差値の温度変化。加熱時のデータを赤い円、冷却時のデータを青い円で示している。

コントラストの温度変化を示すパラメータとして像のピクセル強度の標準偏差 (SDEV) を評価し、その結果を図 2 に示した。SDEV は、温度が上昇して転移温度に近づくにつれて急な減衰を示し、357 K 以上において一定値を示した。一方、冷却時には転移温度より 10 K 程度高い温度から SDEV が増加し始めた。SDEV の下限は測定系の熱などによる揺らぎによるものと考えている。ところで、LEED スポットの強度変化は加熱時と冷却時は同じ振る舞いを示した。これは、この相転移が CDW 転移、つまり 2 次相転移としての振る舞いに一致する。

加熱時と冷却時における SDEV の振る舞いの不可逆性は、LEEM によって観察される情報と、LEED が検出する平均化された情報との質的な違いを表したものと考えられる。また、転移温度以上において、空間パターンが時間によってゆらぐ様子が観察された。このように表面 CDW 相のドメイン秩序の揺らぎが実時間観察されたのはこれが初めてである。

今回の測定から、SPELEEM 装置による実空間観察が表面における相転移や結晶成長について新しい知見を与えられる研究手法であることが示された。今後、現象に合わせた新たな測定手法を考案し、さまざまな表面現象 (気相との反応過程など) にも対象を広げた展開を考えている。

理学研究科化学専攻 代表者 道岡 千城
支援・助言担当事業推進担当者 吉村 一良

近年、実験装置の性能向上に伴い物性研究は急速な進歩を遂げている。しかしながら実験対象となる物質は十分とは言えず、固体物性において統一的理解がなされるためには物質開発は必要不可欠であると考えられる。また学際的な広がりを見れば、その創生される物質は基礎開発研究に重要な物性を有することが望ましく、新しい物性の探求の化学は基礎的な固体物理に対する還元と機能材料に対する提言の二つの重要な役割を担っている。

本プロジェクトでは反強磁性体 CrB_2 に着目し、ホウ素核における核磁気共鳴 (NMR) 測定を通じ、電子状態の解明に取り組んでいる。また Cr サイト、B サイトを他原子で置換することにより反強磁性量子臨界近傍の物質を創生し、超伝導を含めた新たな物性の探索を行っている。このプロジェクトでは特に Cr サイトの置換を行った結晶の合成、及びいろいろな置換系における単結晶育成を行い、NMR 測定から微視的電子状態を解明し、反強磁性臨界近傍の現象についてより統一的理解を得ることを目的としている。

単結晶試料を用いた NMR 測定

図 1 に CrB_2 の結晶構造を示す。 CrB_2 は近年高温超伝導体に次ぐ高い転移温度を有することで注目された MgB_2 と同じ結晶構造である。Cr はホウ素で作られる二次元三角格子ネットワークの間に位置し、同じく二次元三角格子を形成している。これまでの研究において CrB_2 は $T_N = 88\text{K}$ で反強磁性秩序を起こすことが知られている。磁気構造は中性子回折から $[110]^*\text{-c}^*$ 面内で磁気モーメントが回転するサイクロイダル磁性であると考えられている。NMR 測定は粉末試料においてのみ行われているためナイトシフトの温度依存性などの詳細については明らかにされていない。

申請者らは CrB_2 の単結晶 (青山学院大学、秋光教授の提供) を用いて NMR 測定を行うことによりナイトシフト、核スピン - 格子緩和率 ($1/T_1$) の温度依存性と印加磁場の方向依存性を明らかにした。図 2 は磁場を a 軸に平行に印加した場合の転移温度以下におけるスペクトルの温度変化である。スペクトルは転移温度以下で急速に広がり、センターラインを除いて 4 つの新たなピークが現れる。またそれぞれのピークは低温になるにつれてそれぞれ広がる。通常の反強磁性秩序の場合、単結晶を用いて実験を行うと内部磁場に対応した

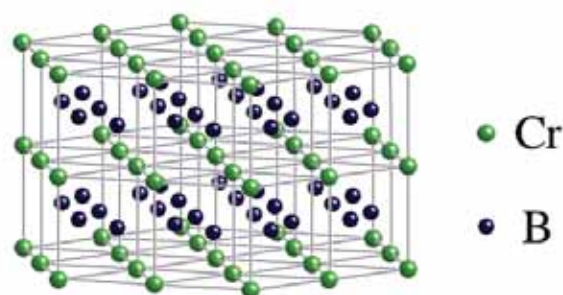


図 1 CrB_2 の結晶構造、Cr と B で形成される三角格子が交互に積み重なっている構造を有する。

共鳴周波数に鋭いピークが現れる。図2のようなブロードなピークは不整合の磁気構造に起因すると考えられる。スペクトルから最大の内部磁場は約 2kOe と見積もられ、常磁性状態のナイトシフト - 帯磁率プロットから得られた結合定数 $-4.4\text{kOe}/\mu_B$ を用いると、 $0.4 \sim 0.5\mu_B$ の秩序化モーメントが得られ、中性子回折の結果に一致する。また $1/T_1$ の温度依存性から、この系が非常に強い反強磁性揺らぎを有することが明らかになった。

Cr_{1-x}T_xB₂ (T = Mo and V) における量子臨界現象

Cr サイトの Mo 置換系、Cr_{0.85}Mo_{0.15}B₂ の NMR スペクトルは低温において広がりを見せるが、反強磁性転移を起こす CrB₂ とは異なり、スピン密度波 (SDW) 状態で説明が付けられる。図3に V 置換系 Cr_{0.7}V_{0.3}B₂ のホウ素 NMR における核スピン - 格子緩和率 ($1/T_1$) の結果を Cr_{0.85}Mo_{0.15}B₂ の結果とあわせて示す。Cr_{0.85}Mo_{0.15}B₂ においては $T_N = 34\text{K}$ 以下で常磁性状態から SDW 状態へと移行し、転移温度直上では点線で示したような二次元古典的繰り込み法から算出された結果と良い一致を示し、高温では赤線で示されたような自己無撞着な繰り込み理論 (SCR) から得られた反強磁性体に対する結果を用いてよくフィッティングされる。一方、Cr_{0.7}V_{0.3}B₂ においては磁気相転移を示さず、図中に赤線で示されたように低温まで SCR の結果で説明される。これらの結果からクロムサイトの置換効果は反強磁性的なスピンの揺らぎを弱める働きがあると考えられる。揺らぎのエネルギーが強い場合、系は反強磁性秩序を起こし、揺らぎが弱くなっていくと反強磁性転移温度が低くなり、さらに反強磁性秩序を起こさなくなり、系がいわゆる弱い反強磁性体となる間に量子相転移がある。Cr_{0.7}V_{0.3}B₂ 及び、Cr_{0.85}Mo_{0.15}B₂ はそれぞれ量子相転移の前後にある物質である。

量子相転移近傍においては、伝導電子のスピンの揺らぎを媒介とした超伝導をはじめとして、エキゾチックな物性が期待される。本プロジェクトでは Cr サイトの置換系での量子相転移近傍の単結晶育成を行い NMR 測定から、量子相転移に対する電子状態の研究を行う。また圧力効果を調べて相転移温度の変化から超伝導の発現までを目指す。

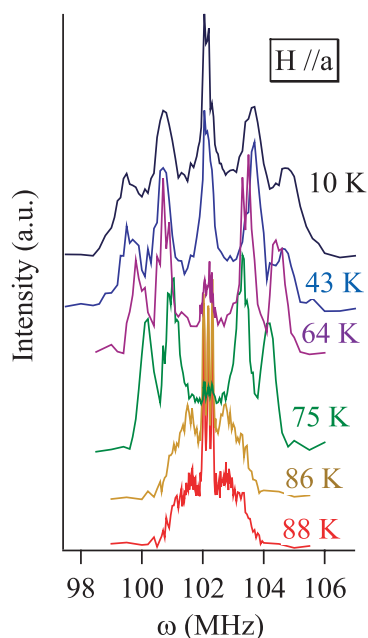


図2 単結晶 CrB₂ の反強磁性転移温度以下における ¹¹B-NMR スペクトルの温度依存性。

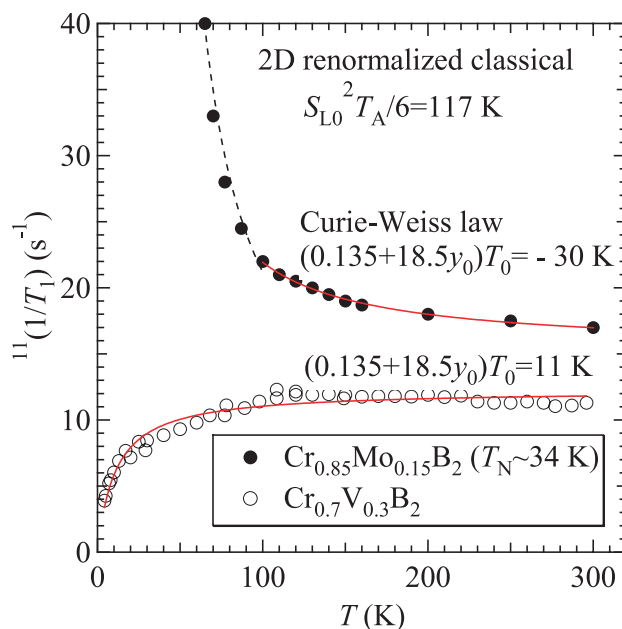
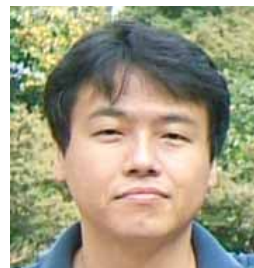


図3 粉末試料 Cr_{0.85}Mo_{0.15}B₂ と Cr_{0.7}V_{0.3}B₂ の ¹¹B-NMR における $1/T_1$ の温度依存性。点線は二次元古典的繰り込みの結果、赤線は SCR の結果を用いてフィッティングを行った結果。



本プロジェクトの目的は、溶液、固体、生体分子などの凝縮系／分子多体系における電子移動、プロトン移動、およびそれらが協同的に起こる過程について、量子効果を適切に取り入れながら、現実的な系に適用可能であるような有効な近似シミュレーション手法を開発し、応用研究を推進することにある。

水素結合やプロトン移動の記述においては、プロトンの量子性を適切に考慮することが重要であるが、現実的な分子シミュレーションを行うには、多くの技術的問題がある。その第一として、数値的に厳密な量子動力学計算では、自由度の数が増すと計算コストが急速に増大し、凝縮系のシミュレーションは実質的に不可能となってしまうという問題がある。したがって、有効な近似手法の開発が不可欠となる。これまで多くの半古典的手法が開発されてきたが、精度を上げると理論が複雑になり、応用の可能性が狭まるというジレンマが存在している。我々は、現実的に興味ある化学現象への応用を特に重視し、半量子的時間依存ハートリー法という新手法を近年開発している。これまで、調和熱浴に結合した二重井戸型ポテンシャルというモデル系、直線型水素結合をもつ一群の固体結晶における構造相関と同位体効果について、一定の成果を得た。

半量子的時間依存ハートリー法の特色は、量子波束の拡がりを表す自由度を含めて位相空間を概念的に拡張し、そこでの拡張されたポテンシャルエネルギー面を考えることで、量子効果とそれへの多体相互作用の影響を図的に理解できる点にある。これは、波束の中心の座標と運動量のみならず、波束の幅を表すパラメータが古典的なハミルトン運動方程式に従うことによる。計算アルゴリズムも比較的単純であり、分子力学シミュレーションプログラムに組み込むことによって、プロトンの量子性を適切に取り入れた計算と解析が可能となると期待できる。以下に、これまでに得た成果の一部を紹介する。

調和熱浴に結合した二重井戸モデル

これは、凝縮系におけるプロトン移動反応のモデルである。半量子的時間依存ハートリー法では、図1のように波束の中心座標 s の他に、波束の幅を表す座標 ρ を考え、その拡張された空間でのポテンシャルを考察する。これに調和熱浴を結合させ、結合の強さを大きく、すなわち環境による摩擦を強くしていくと、図2のように古典的な障壁が次第に回復されてくる。これは、環境による量子性の抑制として理解される。

水素結合における構造相関と同位体効果

次に、この理論を A-H...B 水素結合のモデルに適用した結果を図3に示す。パラメータは結晶構造解析データが多く蓄積されている O-H...O 系に対応したものをを用いた。横軸は二つの酸素

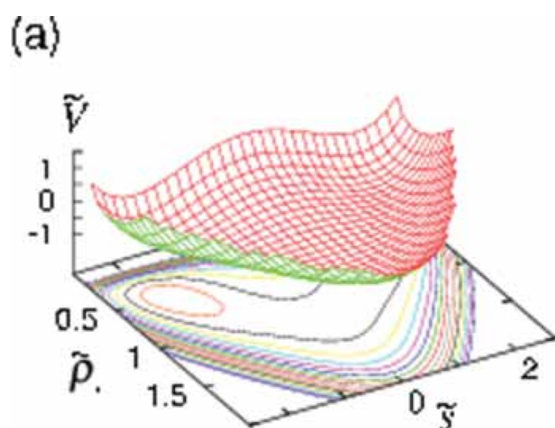


図1 拡張された配位空間における二重井戸ポテンシャル

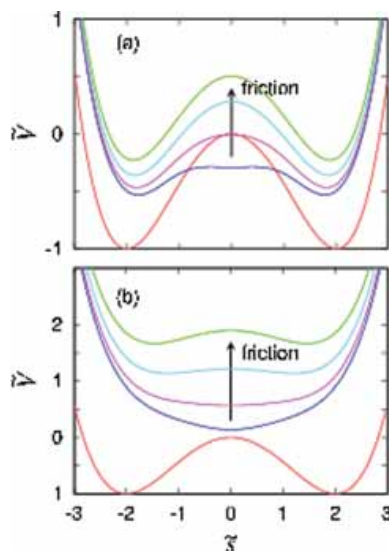


図2 断熱極限での実効ポテンシャルの摩擦による変化

原子間距離、縦軸はOH結合距離を表す。パラメータ $g = 1$ は対称な二重井戸ポテンシャルを表し、 g が1からずれるとポテンシャルは非対称になる。図に見られるように、構造相関の様相はポテンシャルの非対称性に強く依存する。実験からは、異なる物質あるいは異なる条件からのデータが散らばった点の集合としてプロットされ、そこから単一の相関曲線を引くことが試みられているが、今回の計算は個々の系のポテンシャル非対称性に注意を払う必要があることを示唆している。また、計算では対称ポテンシャルの場合に大きな量子効果と同位体効果が見られることも興味深い。

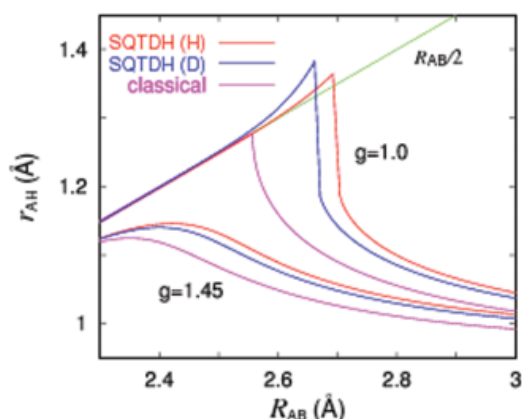


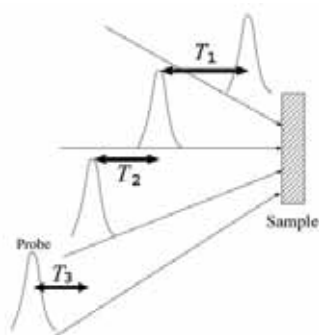
図3 A-H...B 水素結合系の構造相関

現在は、この理論を非経験的電子状態計算と組み合わせる手法の開発に取り組んでいる。これにより、より現実的なポテンシャル面を用いて、例えば複数のプロトンの協動的動力学が関与する現象を解析することが可能になると期待している。



多次元分子振動スペクトロスコピー

多次元振動スペクトロスコピーは分子の構造や特性に対する敏感性から、通常の(1次元)振動スペクトロスコピーでは得られなかった様々な分子の情報を与える新たな実験手法として注目されている。多次元赤外スペクトロスコピー実験では下図のように多数回のパルスをサンプルに当て、その応答を見る。このため、一回の光応答を見る通常の振動スペクトロスコピーよりもより多くの分子情報を得ることができると考えられる。下図は、3次元赤外スペクトロスコピー実験の模式図である。第一パルスが時刻0、第二パルスが時刻 T_1 、第三パルスが時刻 $T_1 + T_2$ で照射され、シグナルは時刻 $T_1 + T_2 + T_3$ で検出される。



モチベーション

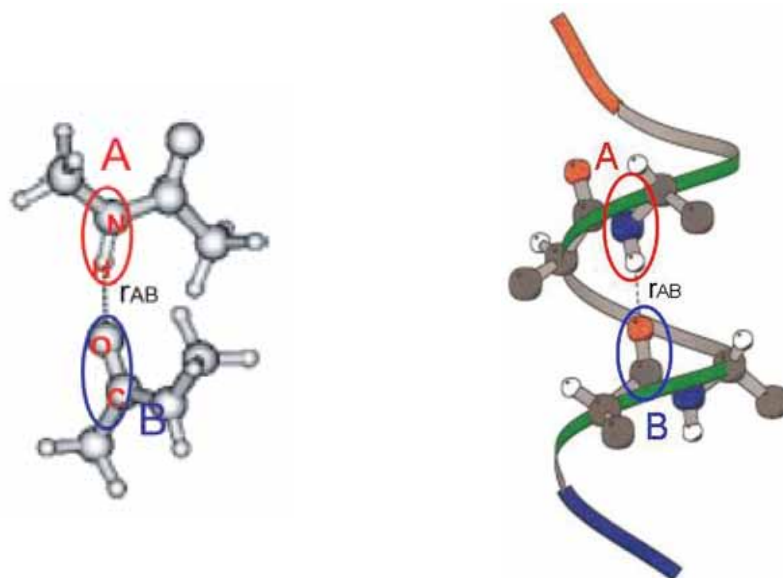
本プロジェクトでターゲットとするのは、次ページの図に示したようなタンパク質などの生化学分子と二量体分子である。図中の分子中にはAとBの間に双極子ー双極子相互作用と双極子ー誘起双極子相互作用という二種類の本質的な双極子相互作用が働いている。これらの相互作用の強さはAB間の距離 r_{AB} の三乗に反比例する。この事実は、もし二つの相互作用の効果を単独で検出できたならば、分子構造(= r_{AB})に関する情報をfsやpsオーダーの時間分解能で直接得ることができることを示唆している。

通常の(1次元)振動スペクトロスコピーでは上記相互作用の単独検出は不可能である。本研究の目的は、多次元赤外スペクトロスコピーの実験結果に解釈を与える理論的枠組みを提案し、多次元赤外スペクトロスコピーの持つ新たな可能性を提示することにある。

理論的枠組み

本プロジェクトでは、上記二つの双極子相互作用、及び分子振動ポテンシャルの非調和性と双

極子と分極率の非線形性を考慮して分子振動モデルの古典的な運動方程式を立て、それを外部電場の1次・2次・3次のオーダーで陽に解くことに成功した。その解を用いれば1次・2次・3次の各オーダーの実時間応答関数を計算でき、さらにそれらのフーリエ変換から各オーダーの赤外スペクトルの形を求められる。ここで1次の赤外スペクトルが通常の赤外スペクトロスコピーに対応し、2次及び3次の赤外スペクトルが多次元赤外スペクトロスコピーに対応する。ただし、2次の赤外スペクトルは等方的な試料においては対称性から検出されないため、本プロジェクトでは3次の赤外スペクトルまで計算した。



成 果

本プロジェクトで得られた結果を用いると、多次元赤外スペクトルにおいて、二つの双極子相互作用・分子振動ポテンシャルの非調和性・双極子と分極率の非線形性の4つの主要な効果の大きさを見積もることが可能となった。また、4つの効果が同程度に出現するような複雑な分子モデルにおいて、多次元赤外スペクトルは双極子-双極子相互作用と双極子-誘起双極子相互作用、そして分子振動ポテンシャルの非調和性をそれぞれ独立に検出することが可能であることを示した。特に、双極子-双極子相互作用と双極子-誘起双極子相互作用がそれぞれ単独で検出できたことで、それらのピーク強度から r_{AB} の値を fs や ps オーダーの時間分解能で直接得ることができる。

また本プロジェクトでは、実験やシミュレーションの簡便な解析ツールとして、本プロジェクトで得られた理論的な表式を基に開発した無償プログラムを web 上で公開している。(参考文献を参照のこと)

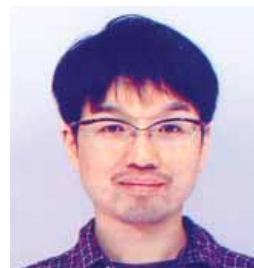
課 題

今後は、開発したプログラムの正確性・有用性を実験やシミュレーションを通してみたい。また、(二体以上の) 多体相互作用効果・分子振動の量子性・溶媒の熱揺らぎの効果が顕著になる分子系においては本プロジェクトの結果は適用できない。今後はそれらの効果を取り入れた拡張の可能性も探っていきたい。

参考文献

Kim Hyeon-Deuk and Yoshitaka Tanimura, to be published in Journal of Chemical Physics Vol.123, 224310 (2005).

理学研究科化学専攻 代表者 林 重彦
 支援・助言担当事業推進担当者 加藤 重樹



本プロジェクトでは、非経験的分子軌道法を用いて DsbB ジスルフィド結合導入酵素の発色中間状態における発色電子状態の同定と、その背後にあるジスルフィド結合生成及びユビキノ還元過程の分子機構の解明を目的とする。DsbB は大腸菌の原形質膜タンパク質であり、ペリプラズム空間内におけるタンパク質のジスルフィド結合生成を伴う酸化的タンパク質フォールディング触媒システムの酵素の一つである。DsbB は自身に二つのジスルフィド結合及び補助因子としてユビキノ分子を結合し、同じくジスルフィド結合を持つペリプラズム空間内の DsbA 酵素と共役して働く。図 1 に DsbB のユビキノ還元過程のスキームを示す。DsbB は、DsbA ータンパク質へのジスルフィド結合導入により還元され自身のジスルフィド結合が解離しているーを結合及びジスルフィド結合交換を通して酸化し、さらに最終的にユビキノを還元することにより DsbB 自身を酸化しサイクルを完了する。

最近、稲葉ら(京大ウイルス研、科学技術振興機構)により、DsbB のキノ還元過程の中間体において、キノ分子がピンク色に発色することが発見された(図 1 参照)。この発色現象は、キノ分子とジスルフィド結合交換に関わるシステイン残基の電子状態の顕著な変化を表していると考えられ、その理解はジスルフィド交換及びキノ分子の還元機能の分子機構に明解な知見を与えると期待される。本プロジェクトは、非経験的分子軌道法を用いて、稲葉らの生化学実験との密接な共同研究により、キノ発色をもたらす電子状態の解明とその機能に対する重要性を明らかにする。

まず、これまでの稲葉らの実験により、DsbB の Cys44 がチオレートとなるような変異や条件においてキノの発色が観測される。従って、キノの発色は Cys44 チオレートとの電荷移動相互作用に起因すると推測される。そのような負電荷を持つ電荷移動錯体は、周りの正電荷環境により実現されることが考えられる。そこで、実験的に近傍の Arg48 を Ala 等に置換する変異を導入したところ、キノの発色及び還元活性が消失した。これは、Arg48 が発色中間状態生成に大きく関与しており、またその中間状態ではキノと Cys44 が電荷

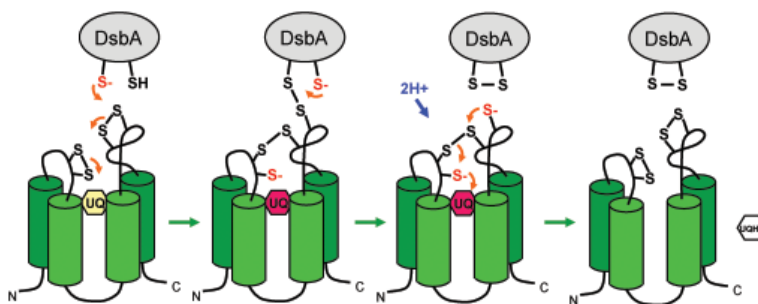


図 1 DsbB のジスルフィド結合交換によるキノ還元過程のスキーム。Cys44 がチオレートアニオンになるとユビキノがピンク色に発色する。

移動錯体を形成しているという推測と一致する。

この推測される電荷移動錯体の発色電子状態を明らかにするために、非経験的分子軌道法を用いて、ベンゾキノ、チオレート及びアルギニン残基からなる電荷移動錯体分子モデルを構築した。その際、電荷移動錯体周辺の様々な変異体を用いて光吸収スペクトル及び還元活性を測定することにより構造

情報の不足を補った。図2AにDFT法により決定された変異体実験を満足する電荷移動錯体分子モデルの構造を示す。アルギニン残基により安定化されたチオレートアニオンがベンゾキノの π 軌道と強く相互作用をしている。さらに、この分子モデルの電荷移動励起状態をMCQDPT法により計算した。その結果、電荷移動励起エネルギーは実験で得られている吸収波長及び強い吸収強度を再現し、このような電荷移動錯体が中間状態の発色の分子起源となり得ることがわかった。

さらに、この電荷移動錯体からチオレートをベンゾキノに接近させることにより、安定な付加物複合体が形成されることがわかった。図2Bにその構造を示す。この付加物複合体生成過程では、チオレートアニオン上の電子がキノの O_2 原子付近へ電子移動を起こし、その電子を安定化させるべくアルギニン残基も構造変化をしている。

これらの結果より、図3のようなDsbBのジスルフィド結合交換及びキノ還元効率的反応モデルが提案される。まず、アルギニンにより安定化されたチオレートアニオンがキノに接触し電荷移動錯体が形成される。実験で発見された発色中間状態はこのような電荷移動錯体の形成を表している。その後、付加物複合体生成により効率的にチオレートアニオンの電子をキノへと流し込む。この付加物複合体のキノンアニオンは非常にプロトン親和性が強く容易にプロトンを取り込む。その後、ジスルフィド結合の相手となる二つ目のチオレートが付加物複合体のS原子を求核攻撃し、ジスルフィド結合を生成するとともに電子をさらにキノンに渡すことによりジスルフィド結合生成に伴う二電子還元を完了する。このように、二つのチオレ

ートアニオンのみの反応では静電反発等の理由により困難であったジスルフィド結合生成が、キノ及びアルギニンとの電荷移動錯体や付加物複合体形成により効率的に触媒されている。

主な研究成果外部報告

“Critical role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in de novo disulfide bond generation by DsbB”, K. Inaba, Y. Takahashi, K. Ito, and S. Hayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 287-292 (2006).

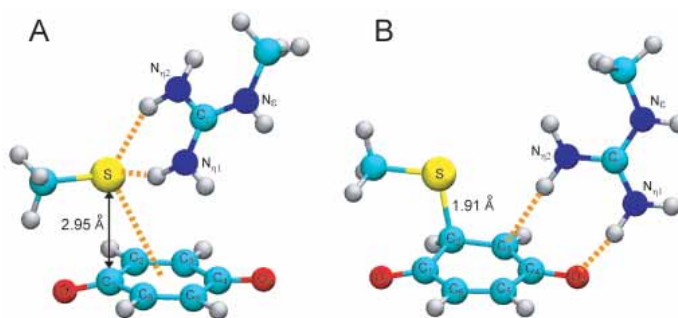


図2 電荷移動錯体(A)と付加物複合体(B)の構造

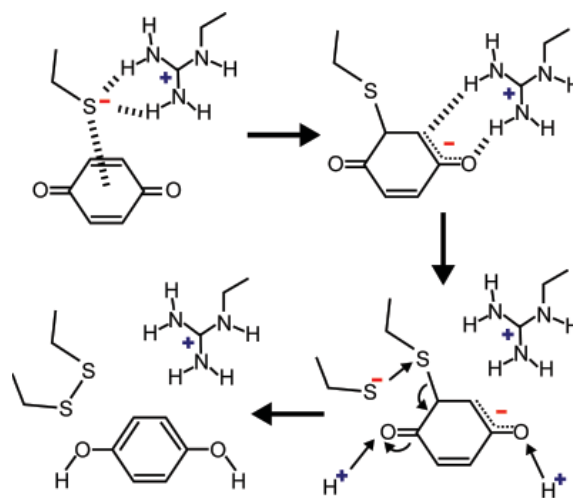


図3 ジスルフィド結合交換及びキノ還元反応スキーム

理学研究科化学専攻 代表者 山本 武志
支援・助言担当事業推進担当者 加藤 重樹



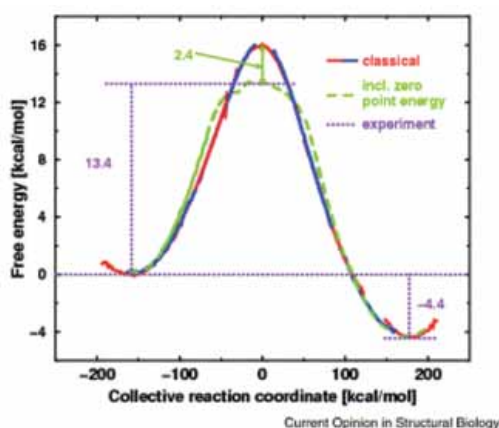
量子効果を計算機シミュレーションに含めること

本プロジェクトの目的は、水素が関与する化学反応の速度を計算機シミュレーションでなるべく精度よく求められるようにするための方法論の開発である。化学反応のメカニズムを調べるためには下地になるポテンシャルエネルギー面が必要である。ポテンシャルエネルギー面の計算はいわゆる量子化学(電子状態理論)の仕事で、以前から精力的な研究が続けられている。特に近年は、CPU性能の圧倒的な向上と計算アルゴリズムの発展(線形スケールリング法や、電子状態計算と経験的なポテンシャル関数をつないで使うQM/MM法)のおかげで、生体分子など多くの原子を含む系のポテンシャル面を精度よく計算する事が可能になってきている。得られたポテンシャル面上で起こるダイナミクスについては、原子核を古典的に考えてニュートン運動方程式を解き時間発展を調べる方法(古典分子動力学法、MD)が最も計算時間が短くてすみ、ポピュラーである。この方法では、系の時間発展をポテンシャル面上の「玉ころがし」の形で理解できるため、化学反応がどのようにして起こるか非常にわかりやすく、メカニズムを調べるのに適している。ただし、軽い原子を含む系、特に水素の移動が関与する系では、古典的な分子動力学法は定性的におかしい結果を与えることがある。予想されるように、その理由は主に零点振動とトンネリングである。例えば、最も基本的な系である液体の水を考えると、水分子中のOH振動は一個あたり数キロカロリーの零点振動エネルギーを持っているが、量子力学によればそのエネルギーは「凍結」されていて周りの分子には渡されない。ただし、OH振動の振幅は零点振動の波動関数のせいで広がったものになっている。問題は、これを適当に古典分子動力学で再現しようとするとは異常な結果がえられる事である。たとえば零点エネルギーに相当する振動エネルギーを水溶媒中の各OH結合に初期条件としてランダムに与えたとなると、系はその後一気に沸騰してしまう。古典MDでは零点エネルギーが回りの分子にどんどんもれていってしまうからである。したがって、古典MDでは一般に、水分子のOH結合を一定の結合長に固定する。(これには速い振動を取り除いてMD計算をより簡単にしたい、という動機もある。)水溶媒では、このように零点振動を「無視」する処理をしても特に問題はおこらないが、水素移動がキーステップになる反応では、その扱いは問題がある。反応に関与する水素の運動を固定するのは当然まずい。かといって、水素原子を古典的に扱って、熱エネルギー(常温で0.6kcal/mol)だけを与えると、零点エネルギーを無視したせいで実際よりも反応のエネルギー障壁が「高く」なってしまう、反応速度をオーダー単位で低く見積もってしまう。いいかえると、実際におこるはずの反応が、古典MDでは数桁長い時間のシミュレーションをしないと一回も起こらないことになってしまう。また古典MDではトンネリング効果も無視しているので、反応は現実よりもさらにおこりにくくなる。これは反応がほとんどトンネリングで進行するような系を調べる場合には致命的である。実際いくつかの酵

素反応では、活性部位周辺のタンパク質の熱揺らぎによって、常温下でも水素の移動が主にトンネリングで起こっていることが報告されている（下図のように 10kcal/mol を超えるバリアの形が環境の熱運動でたまに大きく変調されることによる。）このような系では、水素の量子効果を適切に考慮することが必要になる。

経路積分に基づく反応速度計算

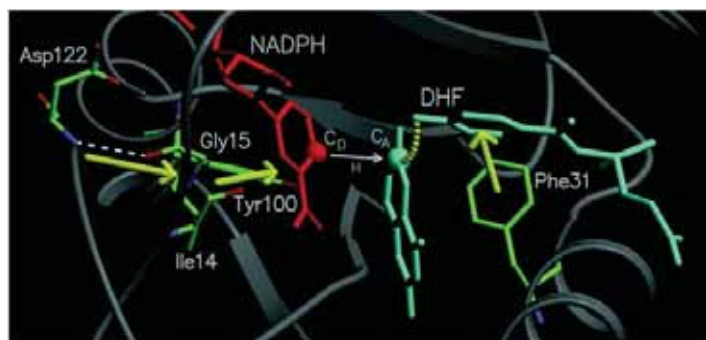
このプロジェクトでは、経路積分の方法を使って反応速度を第一原理的に計算するための方法を研究している。上で述べたような古典 MD の欠点を克服するために、従来は水素を波動関数で表現して量子化する手法がよく使われてきた。この方法は非常に簡便で、さまざまな系に容易に応用できる。しかし、水素だけを波動関数であつかい周りの分子を古典力学で扱う方法は、その 2 つをどう「接続」して時間発展させるか、という点に非常にあいまいさがある。この波動関数の方法と相補的なのが経路積分の方法である。そこでは波動関数でなく密度行列をうまく書き直すことで、水素の量子統計分布を通常の古典 MD で計算できるようにしている。ただし、経路積分の方法は波動関数の方法にくらべるとダイナミクス計算が苦手なので、このプロジェクトでは次の 2 つのアプローチをとってダイナミクス情報を補っている：(i) 厳密な線形応答理論に基づいて、量子論的な反応性フラックス相関関数をキュムラント展開で求めること。(ii) 実時間ダイナミクスだけ半古典極限をとって、密度行列を近似的に時間発展させること。上の (i) の方法は非常に計算コストが低く、今までに行ってきたテスト計算から、水素移動の速度が厳密値から 2 倍程度の誤差内で精度よく求められる事がわかった。そのため、現在は (i) の方法を Amber という汎用の分子動力学パッケージに実装し、これを使って上で述べたような酵素反応やプロトン・電子の共同的な電荷移動反応を調べようとしている。一方、(ii) のアプローチはまだ技術的に未成熟な点が多く、現在は溶液中のシンプルな化学反応を対象としてテスト計算を行っている。



DHFR (dihydrofolate reductase) の自由エネルギー曲面 (Hammes-Schiffer の論文より抜粋)

(左図) 量子効果による反応エネルギーバリアの変化。

(下図) DHFR の部分的な構造。周囲の残基の運動によってバリアの高さが時間的な変調を受ける。



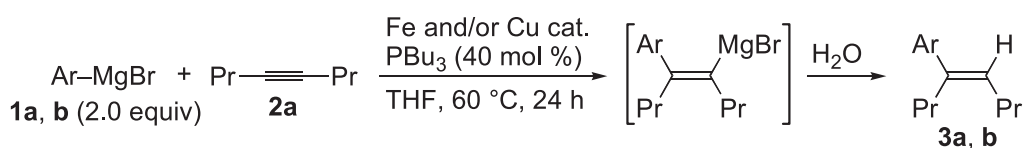
理学研究科化学専攻 代表者 白川 英二
支援・助言担当事業推進担当者 林 民生



1. アルキンのカルボメタル化反応

アルキンの炭素－炭素三重結合に対する有機金属化合物の炭素－金属結合の付加反応すなわちカルボメタル化反応は、生成物であるアルケニルメタルの金属部位を様々な官能基に変換できるので、複雑な炭素骨格の短工程構築法として、有機合成上有用かつ重要である。中でもアリールメタル化反応は、芳香環とアルケンを基本とした π 共役系の構築に有効であるが、ヘテロ原子をもたないアルキンを用いる例は極めて少なく、特にジアルキルアセチレンのアリールメタル化が高収率で進行した例はなかった。今回我々は、鉄および銅の協同触媒作用を利用すると、ジアルキルアセチレンを含む、ヘテロ原子をもたないアルキンのアリールマグネシウム化が良好な収率で進行することを明らかにした。なお、これは協同触媒作用がうまく働いた数少ない例の一つである。

Table 1 Arylmagnesiation of 4-Octyne Followed by Hydrolysis



entry	Ar	amount (mol%)		conv. (%) ^a	yield (%) ^b	E : Z ^c
		Fe (acac) ₃	CuBr			
1	3,5-Me ₂ C ₆ H ₃ (1a)	5	10	>99	74	95 : 5
2		0	10	<1	0	—
3		5	0	57	26	87 : 13
4	2-Me-1-Nap (1b)	5	10	>99	91	98 : 2
5		0	10	<1	0	—
6		5	0	14	2 ^c	>99 : 1

^aDetermined by GC. ^bIsolated yield based on the alkyne. ^cDetermined by GC, GC-MS and ¹H NMR.

2. 協同触媒系の開発

Fe(acac)₃ (5 mol %) および CuBr (10 mol %), PBu₃ (40 mol %) 存在下、4-オクチン (**2a**) を臭化 3,5-ジメチルフェニルマグネシウム (**1a** : 2 当量) と THF 中 60 °C で 24 時間反応させたのち、水で処理したところ、対応するヒドロキシリル化体がシス選択的 (*cis/trans* = 95/5) に収率 74 % で得られた (表 1, entry 1)。鉄触媒なしでは **2a** は全く消費されず、銅触媒なしでは収率が大きく低下した (entries 2–3)。臭化 2-メチル-1-ナフチルマグネシウム (**1b**) の付加では協同触媒作用がより顕著で、銅あるいは鉄単独触媒では **3b** はほとんど得られないのに対して、両触媒を同時に用いた場合の収率は 91 % と良好であった (entries 4–6)。

3. 基質の適用範囲

ジアルキルアセチレンのほか、芳香族およびシリルアセチレンに対して、様々な臭化アリールマグネシウムが付加した (表 2)。反応はシス選択的 (> 90 %) に進行し、非対称なアルキンに対する付加では 95 % 以上の位置選択性で目的生成物が得られた。

Table 2 Hydroarylation of Alkynes Catalyzed by Iron–Copper

$$\begin{array}{c}
 \text{Ar-MgBr} + \text{R}^1\text{—}\equiv\text{R}^2 \xrightarrow[\text{THF, 60 } ^\circ\text{C}]{\begin{array}{l} \text{Fe(acac)}_3 \text{ (5 mol \%)} \\ \text{CuBr (10 mol \%)} \\ \text{PBu}_3 \text{ (40 mol \%)} \end{array}} \text{H}_2\text{O} \rightarrow \begin{array}{c} \text{Ar} \\ | \\ \text{R}^1\text{—C=C—H} \\ | \quad | \\ \text{R}^2 \end{array} \\
 \textbf{1} \qquad \qquad \textbf{2} \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \textbf{3}
 \end{array}$$

entry	Ar	R ¹	R ²	time (h)	yield (%) ^a	E : Z ^c
1	4-MeC ₆ H ₄	Pr	Pr	43	66	97 : 3
2	3-MeC ₆ H ₄	Pr	Pr	24	70	95 : 5
3	2-MeC ₆ H ₄	Pr	Pr	48	61	93 : 7
4	3-MeOC ₆ H ₄	Pr	Pr	24	56	97 : 3
5	3,5-Me ₂ C ₆ H ₃	Bu	Bu	24	67	96 : 4
6	3,5-Me ₂ C ₆ H ₃	Hex	Ph	24	76	94 : 5 (: 1)
7	2-Me-1-Nap	Me	Ph	24	90	99 : 1
8	3,5-Me ₂ C ₆ H ₃	H	Ph	24	36	91 : 5 (: 4)
9	3,5-Me ₂ C ₆ H ₃	Me	SiMe ₃	24	56	72 : 26 (: 2)

^aIsolated yield based on the alkyne. ^bDetermined by GC, GC-MS and ¹H NMR. The values in parenthesis show the ratio of a regioisomer to (*E*)- and (*Z*)-**3**.

4. 基質の適用範囲

Grignard 反応剤 **1b** と 4-オクチン (**2a**) の反応によって得られたカルボマグネシウム化生成物を、ベンズアルデヒドや臭化ベンジルのような求電子剤と反応させると、アルコール **4** やアルケン **5** が得られた。

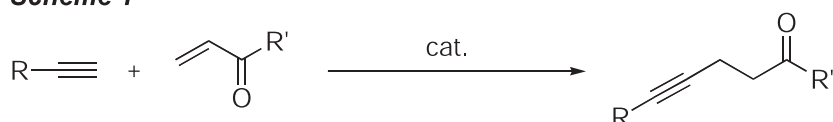
ルテニウムを触媒とする末端アルキン類の アクリル酸エステルへの共役付加反応

理学研究科化学専攻 代表者 西村 貴洋
支援・助言担当事業推進担当者 林 民生



α 、 β -不飽和カルボニル化合物へのカルボアニオンの共役付加反応は、新たな炭素-炭素結合を形成する手法として最も効率のよい反応の一つである。その中でも、末端アルキンを炭素求核種とする反応はカルボニル基を有する内部アルキンを合成でき、それらはさらなる官能基変換が可能であることから有用である (Scheme 1)。従来、共役付加によりアルキンを導入する反応には、量論量のアルキニル種、例えば金属アルキニリド等を用いる方法が広く使われてきたが、末端アルキンを受容体であるアルケンやアルキンへ触媒的に直接付加することができれば、少ない金属排出量で同様の反応を簡単に行うことができる。これまでに、末端アルキンのアルケンへの触媒的共役付加反応として、触媒にロジウムやルテニウムを用いた例が報告されているが、その数は少ない [1]。さらに、これらの反応の多くは受容体であるアルケンに比較的活性の高いビニルケトン類が用いられており、活性の低い不飽和エステル類を用いた例はほとんどない [2]。本研究では、ルテニウムを触媒とする末端アセチレンの α 、 β -不飽和カルボニル化合物への付加反応について詳細に検討した [3]。

Scheme 1



ルテニウムを触媒とする末端アルキンのアクリル酸エステルへの共役付加反応

触媒量の $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ 存在下、フェニルアセチレン (**1**) とアクリル酸エチル (**2a**) を *N*-メチルピロリジノン (NMP) 中、 100°C で 3 時間反応させると、アルキニルエステル (**3a**) が収率 18% で得られた (Scheme 2, Table 1, entry 1)。続いて、有機塩基や無機塩基、アルカリ金属塩などの種々の添加剤を加えて反応を行ったところ、塩化リチウム (LiCl) を加えた場合に収率の向上が確認できた (entries 2 and 3)。さらに興味深いことに、塩化物イオンが大きく解離していることで知られるビス(トリフェニルホスフィン)イミニウムクロリド ($[\text{PPN}]\text{Cl}$) を用いた場合には収率が大きく向上し、反応温度 80°C で 90%、 60°C で 95% の収率で目的生成物 **3a** が得られた (entries 8 and 9)。

Scheme 2

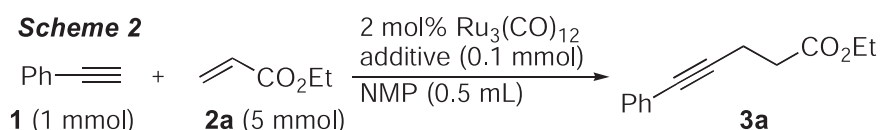
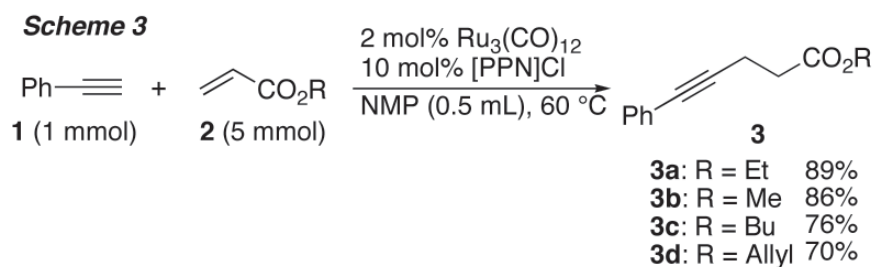


Table 1

entry	additive	temp. (°C)	time (h)	conv. (%) ^a	yield (%) ^a
1	-	100	3	100	18
2	LiCl	100	3	79	35
3	LiCl	80	21	100	68
4	NaCl	80	21	100	42
5	KCl	80	21	96	33
6	NH ₄ Cl	80	21	28	1
7	LiCl	80	15	100	79
8	[PPN]Cl	80	12	100	90
9	[PPN]Cl	60	24	100	95
10	-	60	24	66	11

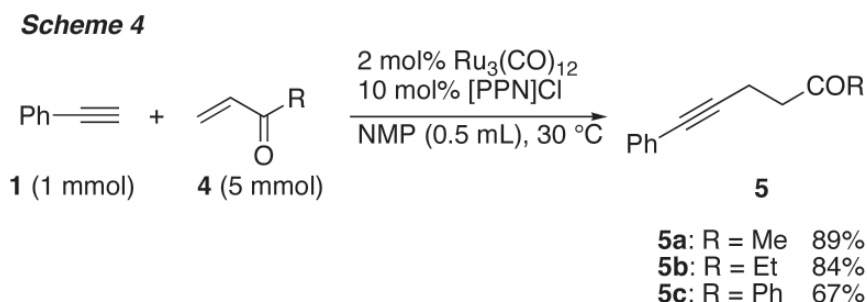
^a Determined by GLC.

先の結果から 2mol% の Ru₃(CO)₁₂、10mol% の [PPN]Cl 存在下、NMP 中 60℃での反応条件を最適とし、種々のアクリル酸エステルとの反応を行った。その結果、いずれの場合にも良好な収率で対応するアルキニルエステル **3** が得られた (Scheme 3)。



ルテニウムを触媒とする末端アルキンのビニルケトンへの共役付加反応

本触媒系ではビニルケトン類 (**4**) との反応も効率よく進行し、これまで報告されている触媒系よりも穏和な室温の条件下で対応するアルキニルケトン **5** が良好な収率で得られた (Scheme 4)。



- [1] (a) Nikishin, G. I.; Kovalev, I. P. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 7063. (b) Picquet, M.; Bruneau, C.; Dixneuf, P. H. *Tetrahedron* **1999**, 55, 3937. (c) Chang, S.; Na, Y.; Choi, E.; Kim, S. *Org. Lett.* **2001**, 3, 2089. (d) Chen, L.; Li, C.-J.; *Chem. Commun.* **2004**, 2362.
- [2] (a) Mitsudo, T.; Nakagawa, Y.; Watanabe, Y.; Hori, Y.; Misawa, H.; Watanabe, H.; Watanabe, Y. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 565. (b) Knopf, T. F.; Carreira, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6054.
- [3] Nishimura, T.; Washitake, Y.; Nishiguchi, Y.; Maeda, Y.; Uemura, S. *Chem. Commun.* **2004**, 1312.

理学研究科化学専攻 代表者 板東 俊和
支援・助言担当事業推進担当者 杉山 弘



細胞において、遺伝子の発現は様々な転写因子と呼ばれる蛋白が遺伝子上流に存在する制御領域に特異的に結合・解離することによって、巧妙にコントロールされている。現在、特定遺伝子の発現制御を目的として、これら DNA 結合蛋白を模倣した様々な人工の転写因子の設計が試みられている。最近、DNA 配列認識能を有する分子であるピロール (Py)・イミダゾール (Im) が見出されている。この Py・Im を基本単位とするポリアミドを構築することにより、任意の DNA の塩基配列を正確に認識する機能分子を設計できる。実際に、転写因子に匹敵する配列認識能と結合定数をもつことから、転写因子結合部における遺伝子発現制御への応用が報告されている。しかしながら、生体内では共通の転写因子を組み合わせることで多くの遺伝子が発現しているため、転写因子と DNA の結合を抑えて遺伝子発現を調節する方法は選択性の面で問題が大きい。

本プロジェクトでは、これらの研究を発展させ、より優れた反応性 Py・Im ポリアミドを設計し、特定の遺伝子発現を止める一般的な手法の開発を目的に研究を行った。これらの手法の有効性を実証するために、特定遺伝子を塩基配列特異的アルキル化によりノックアウトした細胞について、最新の DNA マイクロアレイやプロテオミクスの手法を駆使することによって、がんや多因子疾患等の責任遺伝子を解析してゆく計画である。

反応性 Py (N-メチルピロール) -Im (N-メチルイミダゾール) ポリアミドを特定遺伝子発現制御ツールとして実用化するために、反応性と配列認識能が高いレベルで両立した分子設計の改良と遺伝子機能制御に関する機能評価を進めた。また、Fmoc 固相合成より合成供給された反応性 Py-Im ポリアミドのラットやマウスへの生物学的応用研究も進んでいる。

(1) 配列特異的アルキル化剤としての Py-Im ポリアミドの確立

DNA 配列認識能をもつピロール-イミダゾールポリアミドと全合成品である 1,2,9,9a-Tetrahydro-cyclopropa [c] benz [e] indol- 4-one (CBI) アルキル化部をインドール基で結合させ、任意の塩基配列で DNA を効率的にアルキル化する機能性分子の設計を確立した。インドール基は、従来のビニル基より、合成供給が容易で、かつ、酸やアルカリに対して安定である優れた特徴を有している。合成供給の点でも、固相自動ペプチド合成機による Py-Im ポリアミドの供給が実現した結果、多品種の配列特異的アルキル化剤を安定して供給することが可能になった。また、分子動力学計算とこれまでの合成研究成果に基盤として、まだ生物活性評価の段階には進んでいないものの、10 塩基対を超える配列認識能をもつ反応性 Py-Im ポリアミドの合成にも成功した。

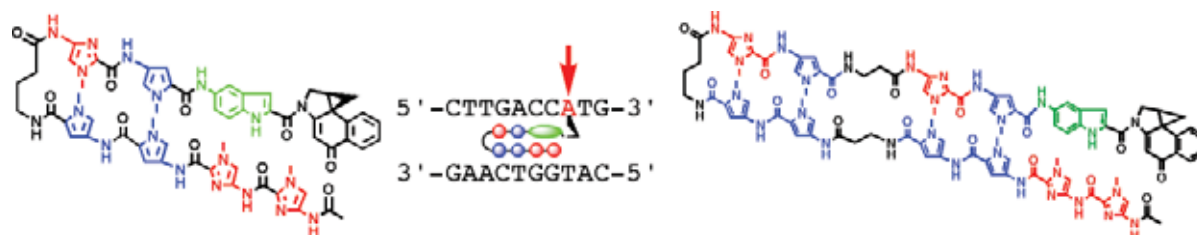


図 1 塩基配列特異的なアルキル化能を有する Py-Im CBI conjugates

(2) 配列特異的アルキル化による生物活性評価

各種反応性 Py-Im ポリアミドを用いて、塩基配列特異的アルキル化が遺伝子機能 (mRNA への転写、蛋白質への翻訳) に与える影響をヒト細胞系にて評価・検討した。その結果、標的とする塩基配列を、遺伝子の mRNA 発現に共有されているプロモーター領域のみに限らず、タンパク質の遺伝情報が集約されているコーディング領域へ拡張することに成功した。重要なことは、配列特異的アルキル化によって、遺伝子の蛋白コード領域中に存在する特定塩基配列を標的とすることが可能であることを示したことである。さらに、2 種類の異なる配列認識能をもつ反応性 Py-Im ポリアミドに対して、DNA チップを用いて遺伝子発現に与える影響を詳細に解析した結果、いくつかの遺伝子に関して、配列特異性の差異に由来する興味深い遺伝子の抑制と活性化が観察された。

現在、本プロジェクトは、生体内の特定塩基配列を精密に標的化することにより特定遺伝子を制御することを可能にする技術への応用を目指し、特定塩基配列認識能をもつ反応性 Py-Im ポリアミドの合成供給を進めている段階である。加えて、この研究に携わっている学生達の合成技術・化学知識・生物学的評価等に関する研究技能の向上にも寄与したと考える。

Publications

- (1) T. Bando, A. Narita, A. Iwai, K. Kihara, H. Sugiyama, C-H to N Substitution Dramatically Alters the Sequence-Specific DNA Alkylation, Cytotoxicity, and Expression of Human Cancer Cell Lines. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 3406-3407.
- (2) K. Shinohara, A. Narita, T. Oyoshi, T. Bando, H. Teraoka, H. Sugiyama, Sequence-Specific Gene Silencing in Mammalian Cells by Alkylating Pyrrole-imidazole Polyamides. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 5113-5118.
- (3) T. Bando, A. Narita, K. Asada, H. Ayame, H. Sugiyama, Enantioselective DNA Alkylation by a Pyrrole-Imidazole S-CBI Conjugate. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 8948-8955.
- (4) T. Bando, A. Narita, S. Sasaki, H. Sugiyama, Specific Adenine Alkylation by Pyrrole-Imidazole CBI Conjugates, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 13890-13895.
- (5) Y. -M. Lai, N. Fukuda, T. Ueno, H. Kishioka, H. Matsuda, S. Saito, K. Matsumoto, H. Ayame, T. Bando, H. Sugiyama, H. Mugishima, S. -J. Kim, Synthetic Pyrrole-Imidazole Polyamide Inhibits Expression of the Human Transforming Growth Factor- β 1 Gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, **315**, 571-575.
- (6) H. Matsuda, N. Fukuda, T. Ueno, Y. Tahira, H. Ayame, W. Zhang, T. Bando, H. Sugiyama, S. Saito, K. Matsumoto, H. Mugishima, K. Serie, Development of Gene Silencing Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting the TGF- β 1 Promoter for Treatment of Progressive Renal Diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005, in press.
- (7) T. Bando, K. Kino, H. Miyazawa, H. Sugiyama, The Possibility of Sequence-specific DNA Alkylation toward Therapeutic Drugs, *Pharm. Regul. Sci.*, 2005, **36**, 1-12. (Japanese Review)
- (8) 板東 俊和, 杉山 弘, DNA の機能と構造を操るケミカルバイオロジー, 有合化, 2005, **63**, 1016-1027. (Japanese Review)

理学研究科化学専攻 代表者 藤橋 雅宏
支援・助言担当事業推進担当者 三木 邦夫



生体内でおこるほとんど全ての反応は酵素に触媒されて進行する。近年 X 線結晶構造解析などの手法により、多くの酵素についてその構成原子の座標が明らかにされた事などから、様々な反応の触媒機構が明らかになってきている。それによればほとんどの酵素は、基質を反応に好ましいコンフォメーションとし、活性化エネルギーのバリアを下げることで、目的の反応を進行させている。活性化エネルギーの低下は通常反応中間体構造の安定化で実現される。正電荷を帯びた反応中間体は負電荷で安定化され、逆も同様なことから、通常酵素は正負どちらかの中間体を經由する反応しか触媒しない。私はこれまでの研究から、*Methanobacterium thermoautotrophicum* 由来のオロチジナーリン酸脱炭酸酵素 (ODCase) と呼ばれる酵素がこの正負両方の中間体を經由する反応、すなわち求核反応と求電子反応の両方を触媒する事を発見した。

ODCase はオロチジナーリン酸から二酸化炭素を脱離させ、RNA の部品であるウリジン一リン酸を合成する反応を触媒する (図 1A)。この反応は求電子置換反応である。これまでの研究により、この ODCase は 6-cyano UMP (6-CN-UMP) を 6-hydroxy UMP (BMP) に変換する反応を触媒することを発見した (図 1B)。

この新しい反応は 3 つの独立した実験で確認した。第一に、1.45Å 分解能で行った X 線結晶構造解析は明らかに 6-CN-UMP ではなく BMP の電子密度を示していた (図 2)。この電子密度図中では炭素・窒素・酸素が区別できた。第二に質量分析を用いた実験を行った。ODCase と 6-CN-UMP を混合し、すぐに質量分析したところ、ODCase と 6-CN-UMP 複合体のピークが得られた (図 3A、27694 の peak)。しかし混合後 7 日間静置し質量分析を行ったところ、BMP と ODCase 複合体のピークが得られた (図 3B、27687 の peak)。第三に、BMP が ODCase の非常に強い阻害剤であることを利用した酵素学的アッセイを行った。6-CN-UMP は ODCase の OMP を UMP に変換する反応をあまり阻害しないが、BMP は強くこの反応を阻害する。ODCase と 6-CN-UMP の混合物は混合直後は OMP を UMP に変換するが、混合して 7 日間おいたものはほとんど変換活性を持たなかつ

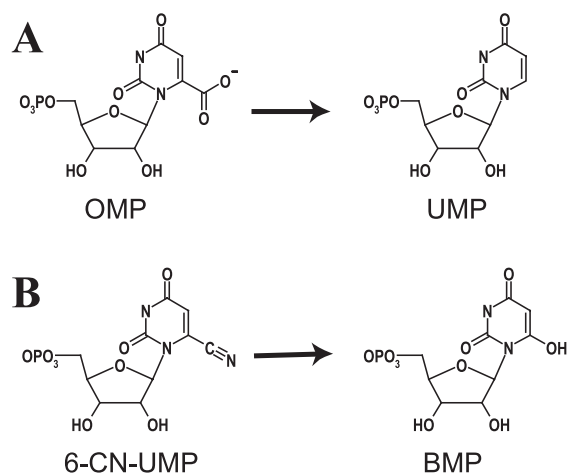


図 1 ODCase の触媒する反応

A 通常の反応 B 新しい反応

た(図4)。これは 6-CN-UMP の BMP への変換を示している。

X線結晶構造解析により 6-CN-UMP と OMP が ODCase 上で同じ位置に結合することはすでに確認している。同じ酵素の同じ反応触媒部位が、求電子置換反応と求核置換反応を触媒する例は非常に珍しく、全く新しいタイプの反応触媒機構の存在が示唆される。

今後はこの反応は完了までに数日と極めてゆっくりと進行することを利用し、反応進行中の酵素の結晶を数時間ごとに瞬間凍結することで反応の進行を止め、反応中間体構造を直接とらえる計画である。同時に水素原子の解析が可能な 1.0Å 分解能程度での構造解析や、複数の ODCase 阻害剤と ODCase の複合体結晶構造解析などの多方面からのアプローチによって、この酵素の反応機構に迫ろうと考えている。

参考文献

Fujihashi, M. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* (2005) **127** (43): 15048-50

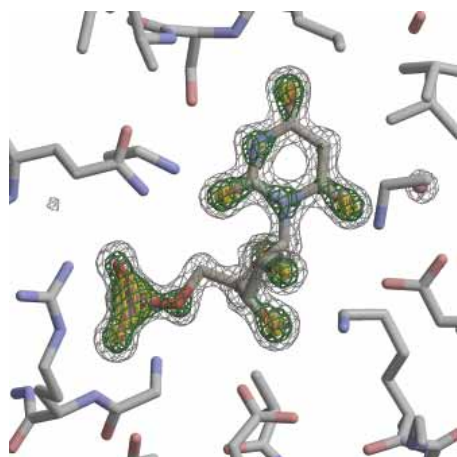


図2 ODCase の反応中心に結合した BMP の結晶構造と電子密度

網目は基質の電子密度。最も強い電子密度が黄、続いて緑、グレーの順。分子モデルは灰色が炭素、青色が窒素、赤色が酸素を示す。

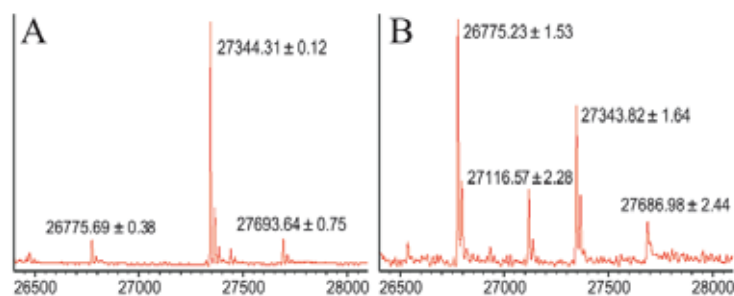


図3 基質と ODCase 複合体の質量分析結果
A: 基質と ODCase 混合直後
B: 混合 7 日後

27344、27687、27694 の peak はそれぞれ ODCase 単独、ODCase と BMP の複合体、ODCase と cyanoUMP の複合体に対応している。混合直後と 7 日後を比べると、複合体のピークがずれたことがはっきりわかる。

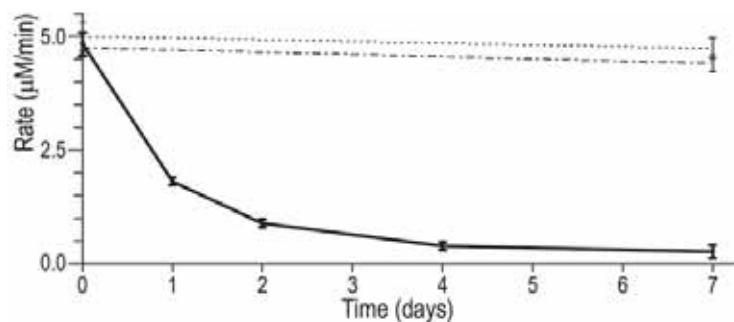
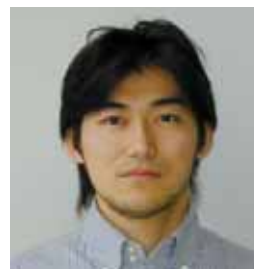


図4 活性測定

実線は ODCase と cyanoUMP を混合して Incubation したものの、点線と一点鎖線は対照実験で、それぞれ cyanoUMP のみ、ODCase のみで Incubation したものの

工学研究科 合成・生物化学専攻 代表者 若森 実
 分担者 岡本 晃充、金井 保、山東 信介
 支援・助言担当事業推進担当 青山 安宏



ヒトゲノムの解読は完了したが、ゲノムデータを解釈する作業はまだ継続中であり、データの利用はまだ始まったばかりである。そこで本プロジェクトは各研究者の専門領域で未知の遺伝子の機能解明を進めるとともに、ゲノム情報の利用を視野に入れた研究を行った。具体的には超好熱始原菌の水素発生代謝系の同定や哺乳動物での細胞内無機イオン濃度の新たな制御機構の同定を行うとともに、個々の細胞の遺伝子発現相関や細胞間コミュニケーションを検出する新技術の開発を行った。

(1) ゲノム情報を利用した超好熱始原菌の水素発生代謝系の解析

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株は、デンプンまたはピルビン酸をエネルギー源として良好に生育し、その際に水素 (H_2) を生産する。我々はこれまでに、*T. kodakaraensis* の全ゲノム解析を完了させている。そこで全ゲノム情報・代謝産物の分析、及び類縁菌の実験報告などから、本菌の水素発生代謝経路の推定を行った。その結果、デンプンはグルコースを経て変形型 EM 経路によりピルビン酸にまで変換されたのち、さらに酸化を受け酢酸が生成する。このとき同時に水素が発生するが、これには膜局在型ヒドロゲナーゼ Mbh が主に関与している。また一方で、ピルビン酸のアミノ基転移反応により還元生成物であるアラニンが生成する。この過程で、細胞質局在型ヒドロゲナーゼ Hyh が H_2 の吸収反応を通じ、アラニン生成に必要となる NADPH の供給に関与していることを実験的に明らかにした (図 1)。

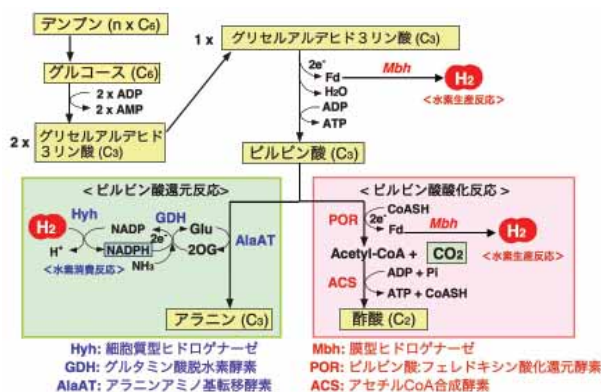


図 1 *T. kodakaraensis* の推定水素発生代謝系

(2) カルシウム透過型陽イオンチャネルの機能解析と反応場の解析

生体においては細胞内外の無機イオン濃度はある範囲の中に厳密に保たれている。例えば、 Ca^{2+} は細胞外が約 2mM、細胞内が 100nM 以下に保たれている。しかし、神経伝達物質によりリガンド作動性チャネルが、膜電位変化により電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開閉し電気化学ポテンシャルに従って Ca^{2+} が細胞内に流入する。すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度は 10 μ M オーダーまで上

昇する。我々は、上記2系統の Ca^{2+} 透過型チャネル以外に新たなチャネル (TRPC5) を同定し、その機能解析と形質膜への集積メカニズムについて研究した。TRPC5 をコードする遺伝子を human embryonic kidney (HEK) 細胞に導入し TRPC5 を発現させ、fura-2 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定とパッチクランプ法による膜電流の測定を行い、TRPC5 の機能解析を行った。TRPC5 は形質膜に発現する Ca^{2+} や Na^{+} や K^{+} 透過型陽イオンチャネルであり、ムスカリン受容体や $\text{P}_{2\text{Y}}$ 受容体刺激により開口した。また、薬物やドミナントネガティブ体を使った実験から TRPC5 の形質膜への集積には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇 $\rightarrow \text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン $\rightarrow$ myosine light chain kinase の経路が関与していることが明らかになった。

(3) 核酸構造応答性蛍光色素の開発

蛍光色素の中には、アリルピレンやジアルキルアミノベンゾニトリルなどの2種類の二重項励起状態、LE (locally excited state) と ICT (intramolecular charge transfer state) を有し、二重蛍光を発する色素がある。これらユニークな特徴を有する色素を生体分子中に導入した例はまだない。我々は、合成した 1-(4-ジメチルアミノフェニル)ピレン-8-カルボン酸を DNA 中に共有結合を介して導入し、その蛍光挙動の変化を検討した。380nm の励起光を照射した結果、1 本鎖 DNA 状態では、540nm での ICT 蛍光発光 (オレンジ色) が主であったが、相補鎖と 2 本鎖を形成すると ICT 蛍光が減少し、440nm の LE 蛍光 (混色によってピンク色) が強く現れた。Stevens-Ban プロット解析を行うことによって、2 本鎖構造の中に色素が取り込まれることによって ICT 蛍光のための構造緩和が規制されることが明らかになった。構造緩和の規制は極低温で行われるのが通常であり、常温でその制御ができたことは異例である。またこの現象は、ひとつの色素の標識によって生体高分子の構造変化に応じた2種類の蛍光色を得られる点で、大変有意義である。

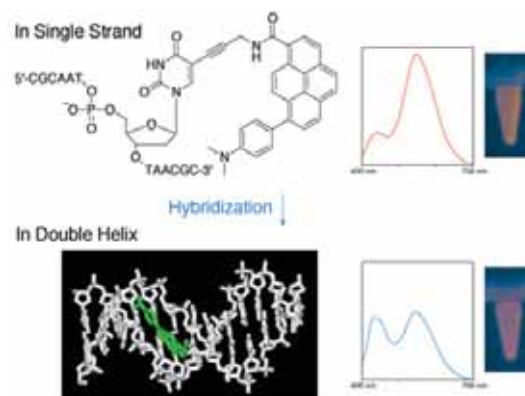


図2 二重蛍光性蛍光色素導入核酸

(4) ゲノムから直接転写可能な非修飾 RNA をもちいた遺伝子発現検出系の構築

従来の遺伝子診断・発現モニタリングはすりつぶした細胞より抽出した DNA/RNA を用いて行われており、遺伝子の変異、発現状況は全細胞の平均値として取り扱われてきた。細胞群を単一細胞の集合 (システム) と見た場合、そのシステム内における各単一細胞の状態相違を時間・空間的パラメータと共に計測し、制御する技術は、「システムとしての細胞ネットワーク」に対する新たなアプローチとなりえる。このような長期目標の実現には、細胞の多様性の根源である細胞膜を破壊しない生細胞適合型の遺伝子検出・診断手法が必須である。我々は細胞内蛋白質翻訳システムを利用したアプローチ「非修飾 RNA を用いる細胞内遺伝子センシング」系の構築に挑戦した。具体的には細胞内に存在する蛋白質翻訳機構を利用し、ステム・ループ型 cis-repressing を構造を有するセンサー mRNA を用いて遺伝子検出・診断を行うものである。実際、標的 DNA/RNA を一塩基の精度で識別し、検出することに成功した。

本ミニプロジェクトにより生物機能の新たな解明が進み、新技術の開発の為の基礎的データも得られた。現在は更なる機能解析の為に、共同でプローブの開発や抗体の作製を計画中である。また、本プロジェクトに参加してくれた大学院生が中心に、教室の垣根を越えて、教員の関与なしで、学部学生にも参加を呼びかけて自主的に生化学の勉強会を行っている。本ミニプロジェクト

トにより教員の横の繋がりを深めるのみならず、学生への教育効果も上がっていると自負している。

主な研究成果外部報告

・学会報告等

- (1) T. Kanai, “Physiological analysis of three NiFe-hydrogenase orthologues in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*”, 8th. International Conference on Thermophiles Research (Thermophiles 2005), 2005.9.18-22, Gold Coast, Australia (Poster)
- (2) A. Okamoto, “Pyrene-labeled base-discriminating fluorescent DNA probes for homogeneous SNP typing”, XX IUPAC Symposium on Photochemistry, 2004.7.17-22, Granada, Spain (Oral Contribution)
- (3) A. Okamoto, “Sequence-selective 5-methylcytosine oxidation for epigenotyping”, 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2005.9.20-22, Fukuoka, Japan (Oral Presentation)

・論文発表等

- (1) “Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1”, T. Kanai, H. Imanaka, A. Nakajima, K. Uwamori, Y. Omori, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka, *J. Biotechnol.*, **116**, 271-282 (2005).
- (2) “Ca²⁺/calmodulin dependent myosin light chain kinase is essential for activation of TRPC5 channels expressed in HEK293 cells.” S. Shimizu, T. Yoshida, M. Wakamori, M. Ishii, T. Okada, M. Takahashi, M. Seto, K. Sakurada, Y. Kiuchi, and Y. Mori, *J Physiol (Lond)*, in press.
- (3) “Monitoring DNA Structures by Dual Fluorescence of Pyrene Derivatives”, A. Okamoto, K. Tainaka, K.-i. Nishiza, and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13128-13129 (2005).
- (4) “Doubly Catalytic Sensing of HIV-1 Related CCR5 Sequence in Prokaryotic Cell-Free Translation System Using Riboregulator-Controlled Luciferase Activity”, S. Sando, A. Narita, K. Abe, and Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5300-5301 (2005).