■■■■ ミニプロジェクト 課題一覧と実績報告 ■■■■ 平成17年度採択ミニプロジェクト ■新規物性機能探求領域■ ■新規物質創製変換領域■ 高効率的分子変換手法の開発 遷移金属を触媒とする高選択的 炭素炭素結合形成反応の開発 工学研究科 合成・生物化学専攻 菅 誠治・大村 智通・松田 学則 理学研究科 化学専攻 支援・助言担当 事業推進担当者 西村 貴洋 村上正浩 支援·助言担当事業推進担当者 245 林民生 258 分光型光電子・低エネルギー電子顕微鏡 ■生体関連物質化学領域■ (SPELEEM)による In/Cu(001) 表面の 相転移の実空間観察 特定遺伝子を制御する 反応性ポリアミドの開発 理学研究科 化学専攻 八田 振一郎 理学研究科 化学専攻 支援·助言担当事業推進担当者 板東 俊和 有賀 哲也 支援·助言担当事業推進担当者 249 杉山弘 262 精密構造変換解析領域 ロドプシン光受容タンパク質中の 超好熱古細菌 Sulfolobus tokodaii 由来 レチナール光異性化反応動力学 Photolyase の結晶構造解析 理学研究科 化学専攻 理学研究科 化学専攻 林重彦 藤橋 雅宏 支援·助言担当事業推進担当者 支援・助言担当 事業推進担当者 加藤重樹 三木 邦夫 252 266 外部ポテンシャル表現を用いた 遺伝子を用いたシステム生物化学---生物機 ab-initio 自由エネルギー面の理論と 能の解明と新技術の開発に関する基礎的研究 プロトン・電子の協同的な移動反応への応用 工学研究科 合成・生物化学専攻 理学研究科 化学専攻 若森 実・金井 保・ 山東 信介・王子田 彰夫 山本 武志

山本 武志 支援・助言担当 事業推進担当者 加藤 重樹 256

支援・助言担当 事業推進担当

青山 安宏

270

## 平成18年度採択ミニプロジェクト

■新規物性機能探求領域■

極限環境下での新物質・物性

#### 高圧力顕微鏡の開発と生体系への応用

理学研究科 化学専攻 西山 雅祥 国際融合創造センター 木村 佳文 支援・助言担当 事業推進担当者 寺嶋 正秀 291

#### ■新規物質創製変換領域■

新規有機合成手法の探索と展開

理学研究科 化学専攻 忍久保 洋・白川 英二・加納 太一 支援・助言担当 事業推進担当者 大須賀 篤弘・林 民生・丸岡 啓二 295

■生体関連物質化学領域■

クロマチン高次構造制御タンパク質の 構造機能相関

> 工学研究科 分子工学専攻 有吉 眞理子 支援・助言担当 事業推進担当者 白川 昌宏 299

## 多核多次元 NMR を使った 細胞内タンパク質の *in vivo* 観察

工学研究科 分子工学専攻 杤尾 豪人 支援・助言担当 事業推進担当者 白川 昌宏 301

## 二酸化炭素を利用した選択的分子変換

工学研究科 分子工学専攻 宍戸 哲也 278

理学研究科 化学専攻

中西 和樹・奥山 弘・ 前里 光彦・道岡 千城

274

支援・助言担当 事業推進担当

有賀 哲也・齋藤 軍治・吉村 一良

<mark></mark>精密構造変換解析領域

分子分光シミュレーターの開発

理学研究科 化学専攻 金 賢得・安藤 耕司・谷村 吉隆 282

## 高速走査高感度顕微分光法の開発と 光合成膜研究への応用

理学研究科 化学専攻 熊崎 茂一 支援・助言担当 事業推進担当者 寺嶋 正秀 284

## キャビティリングダウン分光法を用いた 大気中ラジカル計測装置の開発

工学研究科 分子工学専攻 中山 智喜 支援・助言担当 事業推進担当者 川崎 昌博 287

## 高効率的分子変換手法の開発

工学研究科 合成・生物化学専攻 代表者 菅 誠治 分担者 大村 智通・松田 学則 支援・助言担当 事業推進担当者 村上 正浩



化学物質生産の根幹をなす分子変換の効率化は有機合成の基本命題であり、持続可能な社会実 現のための真に力量ある効率的分子変換手法の開発が望まれている。本プロジェクトでは、(1) 効率的炭素カチオンプールの創製法、(2) 有機ホウ素・ケイ素反応剤の効率的合成、(3) 白金触媒 による効率的アレンインの環化反応の3つのテーマに焦点を絞り、効率的分子変換法の開発を 行った。

(1) 効率的炭素カチオンプールの創製法:われわれはこれまでに有機化合物を低温下で電気化学 的に酸化することで炭素カチオンを蓄え、これを合成化学的に利用する方法論の開発に取り組ん できた (カチオンプール法)。カチオンプール法は高活性な炭素カチオンを比較的高濃度に蓄え ることができる点にその特長があるが、発生・蓄積には電解反応に要する時間(通常数時間程度) が必要であり、炭素カチオンはその間安定に存在できるものでなければならないという制約が あった。この問題点を解決するために、カチオンの発生段階をすばやく行う方法を開発すべく検 討を行った。その結果、ArSSArの低温電解酸化により生じる ArS(ArSSAr)<sup>+</sup> (アリール (ビスアリー ルチオ)スルホニウムイオン)を反応させることにより、チオアセタールからアルコキシカルベ ニウムイオンのプールを迅速に発生・蓄積できることを見出した。ArSSAr (Ar=*p*-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)を低 温電解酸化することにより生成・蓄積した ArS(ArSSAr)<sup>+</sup> (*step 1*)に対して、チオアセタール 1を 加え、5分間撹拌した後 (*step 2*)、炭素求核剤であるアリルトリメチルシランを加えたところ (*step 3*)、対応するアリル化生成物 3 が 89% の収率で得られた。また、*step 2*の溶液を直接 NMR 測定 することにより、アルコキシカルベニウムイオン 2 が確かに蓄えられていることを明らかにした。



本法ではアリルシラン以外にもエノールシリルエーテルやケテンシリルアセタールなどの炭素求 核剤を用いることができ、また、さまざまなチオアセタールをカチオンの前駆体として用いて同 様の反応を行うことにより、対応する炭素-炭素結合生成物が高収率で得られた(インダイレク トカチオンプール法)。

(2) 有機ホウ素・ケイ素反応剤の効率的合成:同一分子内にホウ素とケイ素を含有する有機金属 化合物は、それぞれの元素に特徴的な反応性を利用した多様な分子変換を可能にする複合型反応 剤としての応用が期待できる。本プロジェクトでは、複数の不斉炭素中心を有する有機分子の立 体選択的構築に役立つ有機ホウ素・ケイ素反応剤の効率的創製を目的として、遷移金属触媒によ るアルケンへの分子内シリルホウ素化の開発に取り組んだ。白金触媒の存在下、(ボリルシラニ ル)ホモアリルエーテル1をトルエン中加熱することにより、分子内シリルホウ素化が効率よく 進行し、炭素-炭素二重結合へのボリル基とシリル基の位置選択的同時導入が達成できることを 見出した。注目すべきことに、本反応は白金触媒の配位子により生成するオキサシラサイクルの 相補的な立体化学制御が可能であり、PCyPhzを用いた場合に trans 体を (*trans/cis=*81:19-92:8)、 ホスファイト2を用いた場合に cis 体を (*trans/cis=*8:92-6:94)、それぞれ高選択的に合成すること に成功した。得られたホウ素・ケイ素反応剤は、鎖状ポリオールのジアステレオ選択的合成に利 用することができる。一例として、ボリル基選択的な1炭素増炭反応を行った後玉尾酸化条件を 適用してボリル基とシリル基を同時酸化することにより、1,3,5-トリオールの2つのジアステレ オマーを効率的に合成することができた。



(3) 白金触媒による効率的アレンインの環化反応:アレンインを用いる効率的な分子変換手法の 開発に取り組み、白金触媒によるアレンインの環化反応を二つ開発した。本環化反応においては、 適切な溶媒の選択によって環化生成物を作り分けることができるという興味深い結果が得られ た。アレンイン1をトルエン中80℃で加熱したところ、環化異性化反応が進行し二環性シクロ ブテン2を与えた(式1)。同様の反応をメタノール中70℃で行ったところ、形式的な水和を伴 う環化反応によって3-ベンゾイル-4-アルケニルピロリジン3が得られた(式2)。



## Development of highly efficient molecular transformations

Seiji Suga, Toshimichi Ohmura, Takanori Matsuda Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry Graduate School of Engineering

(1) A highly efficient method for generation and accumulation of cation pools: We have recently developed the "cation pool" method, in which highly reactive organic cations are generated and accumulated in the absence of nucleophiles. In this method cations are generated by the low temperature electrochemical oxidation of a substrate. Because electrochemical reactions take place only on the surface of the electrode, the accumulation of a cation usually takes several hours. Therefore, the applicability of the method strongly depends on the stability of the cation that is accumulated. We herein report that a sequential one-pot indirect method for the generation of alkoxycarbenium ion pools from thioacetals. The reagent electrochemically generated from ArSSAr is well characterized spectroscopically and its reaction with a thioacetal to generate "cation pools" is very fast.

(2) Efficient synthesis of organoboron and organosilicon reagents: An intramolecular silaboration of borylsilanyl homoallyl ethers was achieved using a platinum catalyst, giving 1-oxa-2-silacyclopentanes in high yields. The stereoselectivity of the reactions of *sec*-homoallyl ethers 1 strongly depended on the phosphorus ligand of the platinum catalysts used. The platinum complex bearing the PCyPh<sub>2</sub> was found to be the most *trans*-selective catalyst (*trans/cis* = 81:19-92:8), whereas a highly *cis*-selective cyclization was achieved using a platinum catalyst having 2 (*trans/cis* = 8:92-6:94).

(3) Efficient platinum-catalyzed cyclization reactions of allenynes: Two platinum(II)-catalyzed cyclization reactions of allenynes (1,2,7-dienynes) were developed. Allenynes 1 underwent cycloisomerization in the presence of a catalytic amount of platinum(II) chloride at 80  $^{\circ}$ C to give bicyclic cyclobutenes 2. A mechanism involving nonclassical carbocationic intermediates was proposed for the formation of cyclobutenes. On the other hand, allenynes 1 were transformed to 3-acyl-4-alkenylpyrrolidines 3 when treated with the platinum catalyst in methanol at 70  $^{\circ}$ C . In contrast to the cycloisomerization in toluene that produces bicyclic cyclobutenes 2, the carbocationic intermediate is intercepted by addition of an oxygen nucleophile to achieve the formal hydrative cyclization.

## 主な研究成果外部報告

### ・学会報告等 (Presentations)

- 1. 菅 誠治,松本浩一,上岡耕司,吉田潤一"ジアリールジスルフィドの電解酸化により生じる活 性種の構造と反応挙動",日本化学会第86春季年会,2006.3.27-30,船橋
- 2. 菅 誠治, 上岡耕司, 松本浩一, 吉田潤一 "ジアリールジスルフィドの電解酸化により生じる活 性種を用いたチオアセタール類の活性化", 日本化学会第 86 春季年会, 2006.3.27-30, 船橋
- 3. 菅 誠治 "電子移動反応により発生·蓄積した活性種を用いる合成化学", 第 33 回有機反応懇談会, 2006.8.3, 京田辺
- 4. 松本浩一,藤江駿介,上岡耕司,菅 誠治,吉田潤一"低温電解酸化により調製したアリール (ビスアリールチオ)スルホニウムイオンと炭素求核剤との反応",2006年電気化学会秋季大会, 2006.9.14-15,京田辺

- 5. 上岡耕司, 松本浩一, 菅 誠治, 吉田潤一 "インダイレクト法によるアルコキシカルベニウムイ オンの発生・蓄積および反応", 2006 年電気化学会秋季大会, 2006.9.14-15, 京田辺
- 6. Matsumoto, K.; Fujie, S.; Ueoka, K.; Suga, S.; Yoshida, J. "Arylbis(arylthio)sulfonium Ions Generated by Anodic Oxidation at Low Temperature", The 10th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, 2006.11.13-17, Kyoto
- Ueoka, K.; Matsumoto, K.; Suga, S.; Yoshida, J. "Indirect Cation Pool Method. Rapid Generation of Alkoxycarbenium Ion Pools from Thioacetals", The 10th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, 2006.11.13-17, Kyoto
- 8. 大村智通,古川英紀,杉野目道紀"白金触媒によるアルケンの分子内シリルホウ素化:配位子の効果による相補的立体選択性の発現",日本化学会第86春季年会,2006.3.27-30,船橋
- 9. Ohmura, T.; Furukawa, H.; Suginome, M. "Platinum-Catalyzed Stereoselective Intramolecular Silaboration of Alkenes", The 8th International Symposium on Organic Reactions, 2006.4.23-26, Kobe
- 10. 大村智通,古川英紀,杉野目道紀"白金触媒によるアルケンの立体選択的分子内シリルホウ素化", 第 53 回有機金属化学討論会,2006.9.8-9,大阪
- 11. 門脇詳, 呉屋剛, 松田學則, 村上正浩 "白金触媒を用いるアレンインの環化異性化反応", 日本化 学会第 86 春季年会, 2006.3.27-30, 船橋
- 12. 門脇詳, 呉屋剛, 松田學則, 村上正浩, "白金錯体触媒によるアレンインの環化異性化反応および 水和を伴う環化反応" 第 53 回有機金属化学討論会, 2006.9.8-9, 大阪

#### ・論文発表等 (Publications)

- 1. Indirect Cation Pool Method. Rapid Generation of Alkoxycarbenium Ion Pools from Thioacetals. Suga, S.; Matsumoto, K.; Ueoka, K.; Yoshida, J. J. Am. Chem. Soc. **2006**, 128, 7710-7711.
- 2. Ligand-Controlled, Complementary Stereoselectivity in the Platinum-Catalyzed Intramolecular Silaboration of Alkenes. Ohmura, T.; Furukawa, H.; Suginome, M. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 13366-13367.
- 3. Synthesis of 3-Acyl-4-alkenylpyrrolidines by Platinum-Catalyzed Hydrative Cyclization of Allenynes. Matsuda, T.; Kadowaki, S.; Murakami, M. *Helv. Chim. Acta* **2006**, 89, 1672-1680.
- 4. A Direct Entry to Bicyclic Cyclobutenes via Platinum-Catalyzed Cycloisomerization of Allenynes. Matsuda, T.; Kadowaki, S.; Goya, T.; Murakami, M. *Synlett* **2006**, 575-578.

#### 新規物性機能探求

## 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 八田 振一郎 支援・助言担当 事業推進担当者 有賀 哲也

結晶表面において形成される低次元構造は、新規な機能をもつナノ材料の候補として興味が持たれている。このような系が形成される過程では、二次元的な相分離、相変態が起こっている。これらの現象のダイナミクスを理解することにより、形状やサイズの制御が可能になることが期待されている。本プロジェクトでは、表面電荷密度波相転移を起こす In/Cu(001) 表面におけるドメインの消失及び再形成を実空間でその場観察することによって、長距離パターンを決定している要因やミクロな構造との関係、さらにはドメイン成長のダイナミクスと温度との関係などを解析、解明することを目的としている。

Cu(001) 基板上に 0.5 原子層の In が吸着した表面では、約 350 K において可逆的な相転移が起 こる。この相転移は高温相における二次元フェルミ面のネスティングによるパイエルス型の電荷 密度波相転移である。したがって、低温相の構造は高温相より低い対称性をもち、2 次元単位格 子は長方形をなす。基板の対称性との関係性により、低温相では単位格子の長(短)辺が 90°回転 した関係にある二つのドメインが形成される。広い視野では、それらは同じ割合で表面を占有す る。互いに直交する基本格子をもつドメインから回折線は、基板からの回折線と重ならない限り、 重なることはない。低速電子顕微法 (low-energy electron microscopy: LEEM) における暗視野像 (dark-field image) (以後、DF 像) は、超格子の回折線から実像を結像させる投影型顕微法であり、 異なるドメインは明暗のコントラストによって、高い空間分解能(約 50 nm)で区別される。

(1)ドメインの空間パターンの対称性:SPring-8における分光型光電子・低エネルギー電子顕微 鏡(Spectroscopic Photoemission and Low-energy Electron Microscope:SPELEEM)を用いた実験 により、入射条件と散乱強度のバランスを考慮して選択した回折波から得られた DF 像において、 図1(a)に示すように、250–300 nm 程度のサイズを持つドメインが分布している様子が観察され た。このようなパターンに含まれる秩序を見出すため、相関関数の評価を行った。バックグラウ ンド処理を行った後に得た2次元相関関数を図1(b)に示す。相関強度の分布が、視野の水平面 から45°傾けた正方格子のパターンをもつことが分かる。原点のピークの左右に現れている強い 極小についても、その傾向が強く現れた結果と解釈できる。図1(c)に示した対角線上のプロファ イルから、この正方格子の一辺の長さはおよそ300±50 nm 程度であることが分かる。つまり、 この周期性はドメインの空間パターンを反映している。注目されるのは、このようなサブミクロ ンサイズのドメイン構造に基板の4回対称性を反映したような秩序が現れていることである。低 温相の基本格子は、Cu(001)表面の単位格子を(1×1)として、(9√2×2√2)R45°という異方的な 形状をもつが、このように広いスケールでは異方性がないことが分かった。



☑ 1 (a)The LEEM dark-field image of the In/Cu(001)(0.5 ML) surface at 340 K. (b)The twodimensional (2D) correlation function. (c)The line profiles of the 2D correlation function on the diagonal lines (solid lines in (b)).

(2) 相転移によるパターン変化と再現されるサイズ:昨年度、DF 像において相転移のその場観 察を行った結果、加熱前後に観察されたドメインの空間パターンがまったく異なっていたことを 報告した。2 次元相関関数における比較では、この二つの像におけるドメインパターンのサイズ、 および正方格子状のパターンに目立った差は見られなかった。したがって、同じ加熱+冷却処理 を行った表面では、空間パターンが全く異なっていても、サイズや分布には大きさ違いが現れな いことが分かった。また、正方格子のサイズは、冷却過程においてはじめて確認できたときから すでに十分冷却した試料と同じであった。これらの観測結果から、広い視野で観察されるドメイ ン構造は、相転移の際に生じる長波長の揺らぎがそのまま凍結されたことに由来するものと考え られる。

(3) 冷却過程における相関長の成長:相関関数の 原点近傍の傾斜はドメイン境界における微小な ドメインの混在に由来すると考えられる。スケー ルの小さいドメインの転移温度近傍における振 る舞いは、長距離のパターンとは異なる振る舞い を示した。冷却過程における相関関数の変化を図 2に示す。温度が下がるにしたがって傾斜は徐々 に緩やかになっているが、350 K付近からあまり 変化していない。このことは、転移温度から数 K ほど下がったところでドメインの揺らぎ(ドメイ ン境界の運動)が抑制されたことを示している。

(4) 今後の課題: 今後は熱ドリフトの影響を時間 相関解析などによって補正し、一定温度下での時 間的なドメインの揺らぎを解析して、ダイナミ カルな臨界指数の評価などを試みる予定である。 また、低指数面からずれた微傾斜試料を用いたス テップ端などの影響や、ガス吸着による相境界の ピン留め効果などについても実験を行いたいと 考えている。



☑ 2 Temperature change of the radial correlation function during cooling.

# Real-space observation of phase transition on In/Cu(001) by spectroscopic photoemission and low-energy electron microscope (SPELEEM)

## Shinichiro Hatta Division of Chemistry, Graduate School of Science

Much research has focused on low-dimensional structures on crystal surfaces due to their potential as nanometer-size material with novel functions. Understanding of dynamics in nonequilibrium process, as phase separation and phase transformation, would give practical principles to control the size or shape of such a structure. In this research, in situ observation of the phase transition on Cu(001) covered with In of 0.5 monolayer was performed using spectroscopic photoemission and low-energy electron microscope (SPELEEM).

The In/Cu(001) surface at the low-temperature phase has a rectangular unit cell ( $(9\sqrt{2} \times 2\sqrt{2})R45^\circ$ ). The transition to the high-temperature c(2×2) phase takes place at ~350 K. Due to the lower symmetry of the unit cell at the low-temperature phase with respect to the Cu(001) substrate, the two domains with mutually-perpendicular unit cells are formed. These domains can be distinguished in the LEEM image formed using the superstructure diffraction beam. The LEEM image obtained in this way was called the LEED dark-field image. During heating and cooling across the transition temperature, the disappearance and reproduction of these domains were recorded at video rate in the LEEM dark-field. Figure 1(a) shows the domain pattern recorded at 340 K.

The two-dimensional (2D) correlation function was obtained from the LEEM dark-field images. The 2D correlation function for the images at the low-temperature phase showed a square lattice pattern, as shown in fig. 1(b). The side length of the square is  $\sim$ 300 nm corresponding to the mean domain size. It is unexpected that the four-fold symmetry is seen for the domain pattern. This indicates that the anisotropic shape of the unit cell does not affect to the large-scale domain pattern.

The LEEM images showed no contrast at above 360 K. On cooling, the domain becomes gradually visible. At 358 K, while the steady domains were observed, the domain boundary was not clear and the indistinctive area occupied considerable portion of the surface. The 2D correlation function at this temperature showed a square lattice. The side length of the square lattice was almost same as observed at 300 K. However, the spatial pattern in the LEEM image was quite different. It is suggested that the large-scale order of the domain pattern originates from the long-wavelength domain fluctuation frozen at the transition temperature.

The temperature change of the short-scale order was observed by analyzing the slope of the correlation function near the point of origin. With decreasing temperature, the slope of the correlation function became slow, as shown in fig. 2, where the radial correlation functions are displayed. The correlation length  $\xi(T)$  was evaluated from the slope at 50–150 nm. It is found that the growth of  $\xi(T)$  became slow at around 350 K. This result indicates that the dynamical behavior as the domain separation and aggregation was suppressed just below the transition temperature.

#### Presentations

1. *In situ* observation of the phase transition on In/Cu(001), S. Hatta, F. Z. Guo, H. Okuyama, T. Aruga, 5<sup>th</sup> International Conference on LEEM/PEEM, 2006.10.17, Himeji, Japan.

#### 精密構造変換解析

## ロドプシン光受容タンパク質中の レチナール光異性化反応動力学

理学研究科 化学専攻 林 重彦 支援・助言担当 事業推進担当者 加藤 重樹





☑ 1 Structure of Rh. The chromophore, retinal, resides in seven transmembrane helices. 視物質ロドプシン(Rh)は、眼の網膜に存在する光受容タン パク質であり、視覚機能を担っている。図1にRhタンパク質 の構造を示す。RhはGタンパク質結合型受容体タンパク質ファ ミリーの一つであり、光受容によりGタンパク質を結合・活 性化し、視覚のシグナル過程をスタートさせる。Rhの光受容 によるGタンパク質活性化過程の初期過程は、ポリエン構造 を持つレチナールシッフ塩基発色団の光異性化である。図2に 示すように、Rh中では、レチナールシッフ塩基分子は11-cis 型から all-trans 型へと構造変化する。この光化学反応による発 色団の構造変化が、大域的なタンパク質の構造変化を引き起こ し、Gタンパク質の結合・活性化へとつながっていく。

Rh 中のレチナール分子の光異性化反応は、溶液中のそれに 比べ非常に高速であり高い選択性を持つ。溶液中では、光異性 化の時定数は 2~3 ps であり、複数の光反応生成物が生成する のに対し、Rh 中では 200 fs のうちに反応が完了し、11-cis 型 から all-trans 型へ選択的に起こる。また、Rh の類似タンパク 質である光駆動プロトンポンプ機能をもつバクテリオロドプ シン (bR) においても、反応は 200 ~ 500 fs で完了し all-trans 型から 13-cis 型へ選択的に反応が進む。これらのタンパク質 内反応の特徴は、高い光反応生成物の収率 (0.6 ~ 0.7)を与え、 光受容体に求められる高い感受性を可能にしている。

この超高速反

応の動力学を調べるために、これまでに多くの時間分解分光法による研究が行われてきた。特に近年の発展により、この短時間の励起状態緩和過程中に起こる spectral modulation 等の現象が明らかにされている。特に驚きなのは、Rh中の光異性化反応においては、光反応完了後の光生成物においてもコヒーレントな発色団の分子振動に由来する吸収スペクトルの時間的振動が観測されている。これは、タンパク質中という熱雑音が大きな環境中においても、光異性化反応の動力学が反応生成物



☑ 2 Photoisomerization reaction of the retinal chromophore in Rh.

に至るまでコヒーレンスを保持していることを示している。一方、bR 中の光異性化反応では、 励起状態においてはコヒーレントな分子振動が観測されるものの、反応生成物の生成に伴ってコ ヒーレンスは失われる。

本研究では、このようなタンパク質内の反応に特徴的な反応動力学を明らかにするために、Rh の初期過程に対して理論計算によるアプローチにより調べる。われわれは、これまでに非経験的 分子軌道法を用いた QM/MM ハミルトニアンに基づき、多電子状態間の遷移を含む分子動力学 (MD)計算への拡張を通して、bR 中の光異性化反応動力学を直接シミュレーションし、特徴的 な反応動力学の詳細を明らかにしてきた。本研究では、同様の手法を Rhの光異性化反応に適用し、 コヒーレントな反応動力学が果たしてどのように可能となるのかを明らかにし、その生物学的意 味を議論した。

計算手法は以下の通りである。まず、岡田らのX線結晶構造から300K、2 nsの古典的 MD 計算により、14 個の暗状態の初期状態をサンプルした。その初期構造から IMOMM 法を用い た非経験的 MD 計算を行うことにより、タンパク質環境中の光異性化反応動力学をシミュレー トした。その際、QM 領域としてレチナールのβイオノン環を除くポリエン鎖全長を取り、sa-CASSCF(12,12)/DZV 法により基底 (S<sub>0</sub>) 及び第一励起 (S<sub>1</sub>) 状態を電子状態計算に含めた。また、 S<sub>1</sub> と S<sub>0</sub> の再近接エネルギー構造で非断熱的相互作用要素を計算し、電子遷移を記述した。また 比較のために、0K での光異性化反応の計算も行った。

図3に、トラジェクトリに沿った S<sub>1</sub>と S<sub>0</sub>状態のエネ ルギー差の時間発展を示す。14本のすべてのトラジェ クトリーにおいて、光異性化反応は C11=C12 結合の周り の回転に対して起き、およそ200 fsの内に完了している。 従って実験で観測されている高い選択性と反応速度を 再現することに成功している。また、光励起からエネル ギー交差までの時間も 40~90 fs の短い時間領域に分布 しており、少なくとも励起状態ではコヒーレントな反応 動力学となっているといえる。これは、以前の bR のト ラジェクトリと大きく異なっている。bR の場合は、エ ネルギー交差までの時間が 50~500 fs に大きく分布し ており励起状態からエネルギー交差に至る際にコヒー レンスが失われている。このような反応動力学に対す る大きな違いを生み出す分子機構は、レチナール分子 とタンパク質結合ポケットの相互作用によるレチナー ル分子構造の違いから理解される。まず Rh の場合に特 徴的なのは、基底状態においてβイオノン環がポリエ ン鎖の平面に対して強く捩れていることが挙げられる。 励起状態では、その捩れが解消する方向に運動し異性 化反応と協調する。それにより非常に速い異性化の回 転運動が実現されている。一方 bR の場合には、タンパ ク質環境がない場合には、熱揺らぎにより複数の光反 応生成物が得られることが我々の以前の研究より明ら かにされている。従って、タンパク質環境は、そのよ



☑ 3 Time evolution of energy differences between the S₁ and S₀ states along trajectories. Red and light blue lines indicate the differences along the trajectories in the excited and ground states, respectively, at 300 K, corresponding to emission and absorption spectra. A dark blue curve depicts the spectra along a trajectory at 0 K. The curves at 300 K are distributed in a narrow range around the one at 0 K, indicating the thermal perturbation does not strongly affect the reaction dynamics.

うな複数の光反応生成物への経路をブロックし、正しい光反応生成物を与える経路に導いている といえる。その正しい経路を探す間にコヒーレンスが失われるのである。

我々は更に、電子遷移後の熱緩和過程のシミュレーションも行った。時間分解分光実験から、 光励起後 200 fs で transient な中間状態である photo 中間体が生成し、それが 5 ps の時定数で励



☑ 4 Time evolution of potential energies of the retinal chromophore along trajectories of the photoisomerization reaction. Red and light blue curves indicate potential energies of the trajectories in the excited and ground states, respectively. Orange lines depict potential energy of the excited states along the ground state trajectories. Dark blue and purple curves indicate the average energies.

起波長の減少を伴う batho 中間状態へと緩和することが 知られている。本研究では、時間分解過渡吸収シグナル に対応する励起波長の時間変化を直接計算することに より、スペクトル変化の背後にある状態遷移の分子機 構を明らかにすることを目的とした。そのために、電 子遷移後のトラジェクトリを Hartree-Fock 法を用いて2 ps まで伸ばし、そのトラジェクトリに沿って励起エネ ルギーの時間変化を計算した。図4 にその結果を示す。 発色団のポテンシャルエネルギーの変化に、実験結果 によく対応するように、200 fs と数 ps の二成分の時定 数を見出し、後者の緩和過程では吸収波長が短波長シ フトすることを明らかにした。200 fs のダイナミックな 光異性化状態で photo 中間状態が生成され、その際生じ た熱の緩和に伴い励起波長のシフトが引き起こされて いる。

## Molecular Mechanism of the Primary Photochemical Reactions in Rhodopsin Photoreceptor Proteins

Shigehiko Hayashi Division of Chemistry, Graduate School of Science

Rhodopsin proteins function as photo-receptors in vision and bio-energetic processes. For example, visual receptor rhodopsin (Rh) resides in the retina of the eye, and is responsible for vision. The rhodopsin proteins possess inside the proteins a common chromophore molecule, the retinal protonated Schiff base. The activation of rhodopsin proteins starts with an extremely fast (50-500 fs) photo-induced isomerization of the chromophore around a double bond of its polyene chain, which is one of the fastest reactions in nature. In addition to the fast rate, the photoisomerization reaction is highly selective; e.g., the photoisomerization in Rh takes place exclusively around the  $C_{11}=C_{12}$  bond, whereas the polyene chain includes several double bonds that are capable of undergoing isomerization. Such ultrafast rate and high chemical selectively furnish the rhodopsin proteins with high sensitivity to incoming light.

Unveiling the molecular dynamics in electronic and atomic details is requisite for understanding of the reaction mechanism. For the purpose, we have developed an ab initio quantum mechanical/ molecular mechanical molecular dynamics (QM/MM-MD) method, and applied it for molecular simulations of the retinal photoisomerization in the rhodopsin proteins. The method combines ab initio multi-electronic state molecular dynamics of retinal chromophore models with molecular mechanics of the protein motion, allowing us to simulate the reaction dynamics in the proteins without imposing

empirical assumptions for multi-dimensional forces of retinal in the electronically excited and ground states.

The QM/MM-MD simulations were carried out for the photoisomerization in Rh. Similar to another rhodopsin protein, bacteriorhodopsin (bR), which was examined in a previous study, the simulated photoisomerization in Rh is highly bond-selective; only the  $C_{11}=C_{12}$  bond undergoes the isomerization. In contrast to bR, the reaction kinetics of Rh was found to be coherent. All decays of electronically excited states associated with the photoisomerizations complete within 100 fs without losing the coherence. The simulations have elucidated that the photoisomerization around  $C_{11}=C_{12}$  is accelerated by co-rotation around the  $C_6$ - $C_7$  bond in an extended Hula-Twist fashion, which contributes to the fast photoisomerization.

#### **Oral Presentations (Invited)**

- Pacifichem2005 Symposium "Photoisomerization Processes, Torsional Relaxation and the Hula-twist" (Honolulu, USA) Dec. 15-20 (2005). Shigehiko Hayashi "Photoisomerization dynamics of retinal in rhodopsins studied by ab initio QM/MM MD simulations"
- 2. SANKEN International Symposium 2006 "Advanced Science and Technology for Materials, Biology, and Information by Quantum Beams" (Suita, Osaka) Feb. 8-9 (2006). Shigehiko Hayashi "Molecular dynamics in electronically excited states of rhodopsin photo-receptor Proteins"
- XIIth International Congress of Quantum Chemistry Satellite Symposium KYOTO "Reactions in Solution and Biological Systems: Potential Energy Surface and Dynamics" (Kyoto) July 27-29 (2006). Shigehiko Hayashi "Molecular Mechanism of the Primary Photochemical Reactions in Rhodopsin Photoreceptor Proteins"
- 4. 12<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins (Awaji, Hyogo) Jun 4-6 (2006). Shigehiko Hayashi "Theoretical Studies on Spectral Tuning and Photo-chemical Dynamics of Retinal Proteins"
- Indo-Japan Joint Workshop on "New Frontiers of Molecular Spectroscopy" (Kobe, Hyogo) Jun 24-26 (2006). Shigehiko Hayashi "Molecular Mechanism of the Primary Photochemical Reactions in Rhodopsin Photoreceptor Proteins"

#### 精密構造変換解析

## 外部ポテンシャル表現を用いた ab-initio 自由エネルギー面の 理論とプロトン・電子の協同的な移動反応への応用



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

**溶液内反応の平衡・非平衡自由エネルギー曲面**:溶液内化学反応を記述するための最も基本的な 物理量の一つは自由エネルギー曲面である。これは下地にあるポテンシャルエネルギー関数の統 計平均を取ることで得られ、大雑把に言えば気相反応を調べる際のポテンシャル曲面のような役 割を果たす。ここで、ポテンシャル関数は溶質、溶媒を含む多数の自由度の関数であり、どのよ うな現象に着目して統計平均を取るか、に応じていろいろな種類の自由エネルギー関数が定義さ れる。なかでも最も基本的なものは、溶質の興味ある座標(移動する原子の分子間相対位置など) だけを固定し、残りの自由度、特に溶媒をすべて統計平均してしまうもの(平衡自由エネルギー曲 面)である。この場合、自由エネルギー面はその溶質の反応座標だけの関数になり、溶媒について は平衡分布を仮定したことになる。このような平衡自由エネルギー面は、溶媒が「断熱的」に溶質 の運動に追随している描像に対応しており、溶質の化学反応の時間スケールが溶媒和の時間スケー ルより遅い場合に特に有用である。一方、溶媒が平衡分布から熱的な揺らぎで大きくずれたときに、 溶質の反応物状態と生成物状態のエネルギーがマッチして反応が進行するようなものがある。こ のような反応は電荷移動反応に典型的であり、これを記述するためには、溶媒が電荷移動を促進 する分布をどのような確率で取るかについて知る必要がある。これは一般に、溶媒の集団座標(た とえば溶質のエネルギーギャップ)を固定し、残りの自由度について統計平均をとることで得られ、 その結果得られる自由エネルギー関数は非平衡(溶媒和)自由エネルギー面と呼ばれる。

**非平衡自由エネルギー面の ab-initio 計算**:上で述べた自由エネルギー面、特に非平衡溶媒和の 自由エネルギー関数を量子化学と分子動力学計算で求めるポピュラーな方法の一つはいわゆる quantum mechanical / molecular mechanical (QM/MM) 法である。そこでは溶質の電子状態を量子 化学計算で扱い、溶媒を経験的なポテンシャル関数で表し、溶質・溶媒系の分子動力学シミュレー ションを長時間行って統計平均を取る。この方法は非常に汎用的(溶液系だけでなく固体中、た んぱく質中の反応でも変更なく使用できる)だが、溶媒の瞬間瞬間の配置に対して溶質の量子化 学計算を繰りかえし行うので、非常に計算労力がかかる。そのため、一般には比較的安価な量子 化学の方法(ハートリー・フォック法など)に制限され、信頼性の高い電子波動関数(他配置の方 法や結合クラスター法など)を使うのは計算時間的に非常に難しい。

**外部ボテンシャル表現を用いた自由エネルギー面の方法**:上のような QM/MM 自由エネルギー計算 では、溶媒が作る瞬間的な静電場の下で溶質の電子状態を計算する。これを熱的に分布した色々な溶 媒配置に対して繰り返し行って統計平均を取る。ここで面白いことは、溶質の電子状態を計算するた めの電子シュレーディンガー方程式には、溶媒が作る電場だけが外部変数として陽的に入っており、 溶媒分子一個一個の座標はその電場を通じて陰的にしか入っていないことである。つまり、溶質の電 子状態は溶媒分子の運動を静電場の変化を通じてしか感知することが出来ない(注:自由エネルギー 面のような統計計算に限定した話)。このことを積極的に利用するには、溶媒が溶質にかける静電場 を溶媒の集団座標にとって自由エネルギーの計算を行えばよい。これは、溶媒の配置をそれが生成す る静電場に応じてグループ分けし、その各グループにたいしてただ一回だけ溶質の量子化学計算する ことに相当する。(非常に大雑把いえば、QM/MM カノニカルアンサンブルを部分的に「因数分解」し ていることに相当。)この方法は、平均場の方法とは異なり、もとの QM/MM アンサンブルに一切近 似を加えておらず、単に計算の順序をうまく組み替えて溶質電子状態の計算回数を減らした方法に なっている。本研究では、このような表現法の統計力学的な詳細を与え、特に、通常の電子移動反応 や電子・プロトンが共同的に移動する反応の速度式をこの表現の中であらわに導出した。

溶液中ユビキノール酸化反応への応用:アセトニトリル中におけるユビキノール・フェノキシラ ジカル錯体の proton-coupled electron transfer (PCET)反応に上の方法を適用した。この反応は、 Cape らが cytochrome oxidase 中ユビキノンの酸化還元過程の知見を得る目的で実験を行ったモ デル反応である。ここで面白いことは、このようなユビキノール反応の見かけ上の活性化エネル ギーが重水素よりも水素で大きくなることである(逆転した同位体置換効果)。同じ現象が長岡 らのユビキノール・トコフェロール反応の実験でも見られている。本研究では、この反応の非平 衡自由エネルギー曲面を上に述べた方法で求め、溶質・溶媒配置の全体を考慮した「遷移状態」(透 熱自由エネルギー面の交差のうち、一番エネルギーの低い配置)を求めた。この遷移状態の情報 を用いて反応速度や同位体置換効果を見積もったところ、遷移状態でのプロトンにかかるポテン シャル曲面が始原系のそれより振動数の高いものになっており、このようなことが逆転した同位 体効果につながっている可能性のあることが示された。このようなポテンシャル面がどのような 相互作用(特に水素結合)から生じているかは検討中である。

## Ab-initio free energy surfaces in the external-potential representation and its application to proton-coupled electron transfer

Takeshi Yamamoto and Shigeki Kato Division of Chemistry, Graduate School of Science

Chemical reactions in solution are characterized by equilibrium and nonequilibrium solvation freeenergy surfaces. A direct approach for calculating such a free-energy surface is so-called quantum mechanical / molecular mechanical (QM/MM) methods, in which one calculates the solute electronic energy quantum mechanically (using quantum-chemical methods) while treats the solvent molecules with empirical force fields. However, this QM/MM free energy calculation is usually prohibitively expensive due to the excessive number of quantum-chemical calculations required. To avoid this difficulty, we utilized the fact that the solute wave function does not "see" the individual positions of the solvent molecules, but rather reflects only the associated changes in the external electrostatic potential acting on the solute molecule. Based on this fact, we defined a free-energy surface that employs the external electrostatic potential as collective solvent coordinates, and explored how the original QM/MM statistical ensemble can be partially factorized such that it minimizes the number of solute electronic structure calculations without introducing any approximations. We then studied how the classical and mixed quantum-classical rate expressions for charge-transfer reactions can be expressed in this external-potential representation. The resulting scheme was applied to a ubiquinol oxidation reaction in acetonitril in order to obtain mechanistic insights into the inverted kinetic isotope effects observed experimentally for related systems.

## 遷移金属を触媒とする高選択的炭素炭素結合形成反応の開発



理学研究科 化学専攻 西村 貴洋 支援・助言担当 事業推進担当者 林 民生

(1) ロジウムを触媒とするジフェニルホスフィニルアレンの不斉ヒドロアリール化反応

光学活性ジホスフィン配位子を有するロジウム錯体触媒(([Rh(OH)((*R*)-binap)]<sub>2</sub>)存在下、ジフェニルホスフィニルアレン(1)と*p*-トリルボロン酸との反応を行ったところ、高位置選択的に ヒドロアリール化反応が進行し、97% eeの光学純度を持つアリルホスフィンオキシド(2a)が少 量の内部アルケン(3a)とともに高収率で得られることを見出した(図1)。



図1 ロジウム触媒を用いたジフェニルホスフィニルアレンの不斉ヒドロアリール化反応

溶媒としてテトラヒドロフラン (THF)を用いたときにもっとも高い位置選択性を示した。ホウ 素反応剤としては、電子供与性、求引性置換基を持つアリールボロン酸が利用でき、いずれの場 合も高収率、高エナンチオ選択的に反応が進行する (図 2)。



図2様々なアリールボロン酸のジフェニルホスフィニルアレンへの不斉付加反応

本反応では、図3に示したようにアリールボロン酸とロジウム錯体の反応によって生成するア リールロジウム錯体がアレンと反応し、π-アリルロジウム中間体を与える。続く位置及びエナ ンチオ選択的なプロトン化反応によって、光学活性なアリルホスフィンオキシドが生成する。こ の中間体であるπ-アリルロジウム錯体の単離およびエックス線結晶構造解析による構造決定に も成功した。



図3 反応経路およびπ-アリルロジウム中間体の構造

### (2) イリジウムを触媒とするアリールボロン酸の電子不足ジエンへの高選択的1,6 付加反応

触媒量のヒドロキソイリジウム錯体 ([Ir(OH)(cod)]2)存在下、ジエノン(4)とフェニルボロン酸 との反応を行ったところ、高位置選択的に 1,6 付加反応が進行し、フェニル化されたケトン(5) が高収率で得られることを見出した(図4)。この際、生成する可能性がある 1,4 付加生成物(6) は全く見られなかった。



図4 イリジウム触媒を用いたフェニルボロン酸のジエノンへの高選択的 1,6 付加反応

一方、同様の反応条件下、ロジウム触媒を用いると1,4および1,6付加反応が同時に進行した(図5)。 これらの結果から、イリジウム触媒の電子不足ジエンに対する特異的な反応性が明らかとなった。



図5 ロジウム触媒を用いたフェニルボロン酸のジエノンへの付加反応

図6には、様々なアリールボロン酸を用いて反応を行った結果を示した。最初に生成する不飽 和カルボニル化合物の混合物は、パラジウム触媒による水素化反応により飽和カルボニル化合物 へ変換し単離した。様々な電子供与および求引性の置換基を有するアリールボロン酸が利用でき る。また、ジエノン以外にもエステルおよびアミド類に対する選択的1,6 付加反応も進行するこ とが明らかとなった。



図6 イリジウム触媒を用いたアリールボロン酸の電子不足ジエンへの1,6 付加反応

本反応では、アリールイリジウム種(II)に対するジエン部位の配位によって生成する錯体 III のようなイリジウム種を経て選択的な 1,6 付加反応が進行すると考えられる(図 7)。



図7 触媒サイクル

## Transition Metal-Catalyzed Selective Formation of Carbon-Carbon Bonds

Takahiro Nishimura Department of Chemistry, Graduate School of Science

#### (1) Rhodium-Catalyzed Asymmetric Hydroarylation of Diphenylphosphinylallenes

Rhodium-catalyzed asymmetric hydroarylation of diphenylphosphinylallenes with arylboronic acids proceeded in high yields with high regio- and enantioselectivity to give chiral allylphosphine oxides. Treatment of 3-(diphenylphosphinyl)-3-methyl-1,2-butadiene (1) with p-tolylboronic acid (2 equiv) in the presence of  $[Rh(OH)((R)-binap)]_2$  (5 mol % Rh) in THF at 60 °C for 1 h gave the hydroarylation product 2a with 97% ee with a small amount of internal alkene 3a (total yield 97%, 2a/3a = 96/4). The structural determination of the key intermediate, a  $\pi$ -allylrhodium complex, was successful to establish the catalytic cycle of the reaction, which involves the addition of an arylrhodium species to allene forming a  $\pi$ -allylrhodium species and protonolysis of the  $\pi$ -allylrhodium giving hydroarylation product followed by transmetalation regenerating the arylrhodium intermediate.

## (2) Highly Selective 1,6-Addition of Arylboronic Acids to Electron-Deficient Dienes Catalyzed by an Iridium Complex

It was found that highly selective 1,6-addition of arylboronic acids to electron-deficient dienes was realized by use of an iridium catalyst, which gave high yields of the corresponding  $\delta$ -arylated carbonyl compounds with perfect 1,6-selectivity. Treatment of (3E,5E)-3,5-heptadien-2-one (4) with phenylboroxine (1.0 equiv) in the presence of a catalytic amount of  $[Ir(OH)(cod)]_2$  (5 mol % Ir) and H<sub>2</sub>O (0.5 equiv relative to B) in toluene at 80 °C for 3 h gave a mixture of 1,6-adducts, 6-phenylhepten-2-one (5), in 88% yield. The formation of the 1,4-addition product was not detected at all under the present reaction conditions.

#### **Publications**

- Highly Selective 1,6-Addition of Aryl Boronic Acids to α, β, γ, δ-Unsaturated Carbonyl Compounds Catalyzed by an Iridium Complex, T. Nishimura, Y. Yasuhara, T. Hayashi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 45(31), 5164–5166 (2006).
- Rhodium-Catalyzed Asymmetric Hydroarylation of Diphenylphosphinylallenes with Arylboronic Acids, T. Nishimura, S. Hirabayashi, Y. Yasuhara, T. Hayashi, J. Am. Chem. Soc., 128(8), 2556–2557 (2006).
- 3. Asymmetric Addition of Dimethylzinc to *N*-Tosylarylimines Catalyzed by a Rhodium-Diene Complex toward the Synthesis of Chiral 1-Arylamines, T. Nishimura, Y. Yasuhara, T. Hayashi, *Org. Lett.*, 8(5), 979–981 (2006).

## 特定遺伝子を制御する反応性ポリアミドの開発



理学研究科 化学専攻 板東 俊和 支援・助言担当 事業推進担当者 杉山 弘

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の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、精密に制御されている。現在、特定遺伝子の発現制御を目的とし て、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) が注目を集めている。Py-Im ポリ アミドは Streptomyces 族から単離された抗生物質であるディスタマイシンやネトロプシンによ る DNA 塩基配列認識機構を詳細に解析することによって設計された画期的な人工分子である。 転写因子などの DNA 結合蛋白に匹敵する高い結合能と配列認識能によって、特定遺伝子発現の 制御や遺伝子の機能解析の手法として期待できる。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、アメリカ (GeneLab 社、GeneSoft 社) や、英国 (Spirogen 社) で相次いで Py-Im ポリアミドの医薬品への応用開発を目的としたベンチャー企業が設立されており、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て多くの遺伝子が発現しているため、蛋白 -DNA の結合を抑えて発現を調 節する方法は特異性の面で課題が残る。



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。我々の開発した反応 性 Py-Im ポリアミドは、標的の塩基配列に対して共有結合するので、タンパク質をコードしてい る領域もターゲットにでき、選択的な遺伝子の制御が期待できる。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反応」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 ポリアミドのマウスへの生物学的応用研究も進んでいる。

#### 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、 従来のビニル基リンカーより、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。 加えて、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、10 塩基対を超える配列認識 能をもつ反応性 Py-Im ポリアミドの合成や二本鎖ヒトテロメア配列を標的とする反応性 Py-Im ポ リアミドの開発にも成功した。



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

#### 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培養細胞系にて GFP 発現阻害に関する機能評価・検 討を進めた。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ド領域へ拡張することに成 功した。重要な点は、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ている。

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。反応性 Py-Im ポリアミドによる理想的な配列特異的 アルキル化剤の実現は、特定遺伝子発現制御分子として医学的応用も期待できる。我々の開発し た特定配列を標的とするアルキル化 Py-Im ポリアミドの遺伝子発現制御,細胞増殖活性に関する 実験データは、Py-Im ポリアミドの特定遺伝子発現制御分子としての有用性を十分期待させるも のである。従って、DNA マイクロアレイ技術を用いたプロテオーム解析などのバイオインフォ マティクス技術と組み合わせて用いることによって、未知疾患遺伝子の機能解析にも応用できる だろう。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。

# The development of the alkylating Py-Im polyamides to control specific gene expression

Toshikazu Bando Division of Chemistry, Graduate School of Science

In recent years, many diseases including cancer, hereditary and viral diseases can be understood by the DNA and RNA sequence. Direct control of the expression level of specific gene would provide promising approach for therapy. N-methylpyrrole (Py) and N-methylimidazole (Im) polyamides are new type of small functional molecules that precisely bind to the minor groove of the duplex DNA in sequence-specific fashion: antiparallel paired Im/Py uniquely recognizing G-C base pair and Py/Py pairs recognizing either an A-T or T-A base pair.

One important question to consider is whether the introduction of sequence selectivity to DNAtargeting agents can improve their effectiveness as gene-regulating tools. To address this question, we have designed and synthesized a various types of sequence-specific DNA alkylating molecules by conjugation of Py-Im polyamides and CBI with indole linker, which selectively alkylates at predetermined DNA sequences. We demonstrated that sequence specific alkylating Py-Im polyamides possess gene silencing activities and a promising potency for human cancer cell lines as well as xenograft which carries human cancer cell lines.

We will focus on recent progress of alkylating Py-Im polyamides in view of sequence specificity and biological activities. We expect that such progress in molecular design and the functional analysis of sequence specific DNA alkylating Py-Im polyamides steadily get close to the goal of development of rational biological tools to control specific gene expression.

#### **Publications**

- 1. T. Watanabe, <u>T. Bando</u>, Y. Xu, R. Tashiro, H. Sugiyama, Efficient Genenation of 2'-Deoxyuridin-5-yl at 5'-(G/C)AA<sup>x</sup>U<sup>x</sup>U-3'(X = Br, I) Sequences in Duplex DNA under UV irradiation, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 44-45.
- <u>T. Bando</u>, A. Narita, S. Sasaki, H. Sugiyama, Specific Adenine Alkylation by Pyrrole-Imidazole CBI Conjugates, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 13890-13895
- Y. -M. Lai, N. Fukuda, T. Ueno, H. Kishioka, H. Matsuda, S. Saito, K. Matsumoto, H. Ayame, <u>T. Bando</u>, H. Sugiyama, H. Mugishima, S. -J. Kim, Synthetic Pyrrole-Imidazole Polyamide Inhibits Expression of the Human Transforming Growth Factor- β1 Gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, **315**, 571-575.
- 4. H. Matsuda, N. Fukuda, T. Ueno, Y. Tahira, H. Ayame, W. Zhang, <u>T. Bando</u>, H. Sugiyama, S. Saito, K.

Matsumoto, H. Mugishima, K. Serie, Development of Gene Silencing Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting the TGF- $\beta$ 1 Promoter for Treatment of Progressive Renal Diseases. J. Am. Soc. Nephr. 2006, 17, 422-432.

- K. Shinohara, <u>T. Bando</u>, S. Sasaki, Y. Sakakibara, M. Minoshima, H. Sugiyama, Antitumor Activity of Sequence-specific Alkylating Agents: Pyrrole-imidazole CBI conjugates with Indol linker, *Cancer Science*, 2006, 97, 219-225.
- 6. K. Shinohara, S. Sasaki, M. Minoshima, <u>T. Bando</u>, H. Sugiyama, Alkylation of template strand of coding region causes effective gene silencing, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 1189-1195.
- <u>T. Bando</u>, S. Sasaki, M. Minoshima, C. Dohno, K. Shinohara, A. Narita, H. Sugiyama, Efficient DNA Alkylation by a Pyrrole-Imidazole CBI Conjugate with an indole Lnker: Sequence Specific Alkylation with Nine-Base-Pair Recognition, *Bioconjugate Chem.*, 2006, **17**, 715-720.
- 8. W. Zang, <u>T. Bando</u>, H. Sugiyama, Discrimination of Hairpin Polyamides with an Alpha-Substituted-Gamma-Aminobutyric Acid as a 5'-TG-3' Reader in DNA Minor Groove, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 8766-8776.
- 9. S. Sasaki, <u>T. Bando</u>, M. Minoshima, T. Shimizu, K. Shinohara, T. Takaoka, H. Sugiyama, Sequence-Specific Alkylation of Double-Strand Human Telomere Repeat Sequence by Pyrrole-Imidazole Polyamides with Indole Linkers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 12162-12168.

#### Reviews (2005-2006)

- 1. <u>T. Bando</u>, 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)
- 2. <u>板東俊和</u>, 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)
- 3. <u>T. Bando</u>, H. Sugiyama, Synthesis and Biological Properties of Sequence-Specific DNA-Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamides, *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 935-944.

## 生体関連物質化学

## 超好熱古細菌 Sulfolobus tokodaii 由来 Photolyase の結晶構造解析



紫外線照射によって DNA に生じた損傷のう ち、チミンダイマーに代表されるシクロブタン 型ピリミジンダイマー光産物 (CPD) は、可視光 エネルギーを利用する CPD Photolyase (光回復酵 素) により修復される (Fig. 1)。現在までに大腸 菌・藍藻・好熱菌由来の Photolyase の構造が明 らかになっているが、古細菌由来 Photolyase の 構造解析例はない。 理学研究科 化学専攻 藤橋 雅宏 支援・助言担当 事業推進担当者 三木 邦夫



Fig. 1 Reaction catalyzed by Photolyase

このため我々は古細菌 *Sulolobus Tokodaii* strain 7 由来 Photolyase の結晶構造解析に取り組んだ。 *S. Tokodaii* 由来 Photolyase (St-Photolyase) を大腸菌で発現させ、Ni-NTA, Resource Q または Resource Iso column を用いて精製した。この組み換え大腸菌で発現させた St-Photolyase が、光



Fig. 2 Photoreactive activity of St-photolyase *in vitro*. The activity was measured using the absorption difference at 265 nm between the normal (T-T) and the dimerized (T⇔T) thymines. UV-irradiated oligo (dT)<sub>18</sub> (consisting T⇔T) was incubated with St-photolyase under a fluorescent lamp (open circle). The solid circle symbols represent samples incubated under a dark condition. Non-photolyase containing mixtures were also incubated under a light (open square) and a dark (solid square) conditions.

のエネルギーを用いて DNA 上のチミンダイマーを 回復することを、Fig. 2 の実験で確認した。結晶は 硝酸アンモニウムを沈殿剤とする条件で得られた (Fig. 3)。データの収集は PF-AR NW12 及び SPring-8 BL41XU で行った。位相は好熱菌 *T. thermophilus* HB8 由来 Photolyase (Tt-Photolyase)の構造 (1IQR) をモデ ルとした分子置換法で決定した。データ及び精密化の 統計値を Table 1 にまとめた。

解析した St-Photolyase の全体構造 (Fig. 4) は、 これまでに解析された 3 種の Photolyase の構造と 非常によく似ていた。藍藻・大腸菌・好熱菌由来 Photolyase との Ca 原子の R.M.S.D. は 1.18 - 1.48 Å であった。

Photolyase は集光補因子と触媒補因子の二つの補 因子を持つ。このうちの触媒補因子としては、全て の Photolyase が Flavin Adenine Nucleotide (FAD) を用 いることが知られている。集光補因子としては、大 腸菌由来 Ec-Photolyase は MTHF (5,10-methenyl tetra hydro folylpolyglutamate)を、藍藻由来 An-Photolyse は 8HDF (8 -hydroxy-5-deaza-riboflavin)を、好熱菌由 来 Tt-Photolyase は FMN (Flavin MonoNucleotide)を 用いることが知られている (Fig. 5)。

Table 1. Crystallographic Data Statistics					
Data statistics					
Space group	$P2_1$				
Unit-cell <i>a, b, c</i> (Å)	79.9, 167.7, 89.0				
β (°)	91.5				
Resolution (Å)	50 - 2.80 (2.90 - 2.80)				
Completeness (%)	97.5 (89.7)				
$R_{ m sym}$ (%)	12.2 (29.6)				
Refinement statistics					
Resolution (Å)	50 - 2.80				
No. of uniq reflection	ns 72,621				
No. of atoms	15,170				
$R_{ m cryst}$ / $R_{ m free}$ (%)	22.3 / 24.7				



Fig. 5 Cofactors found in Photolyase



Fig. 3 Crystals of St-Photolyase



Fig. 4 Overall Structure of photolyase from *S. tokodaii* (St-photolyase)



Fig. 6 Electron density map and the structure of the light harvesting cofactor (FAD) found in St-photolyase

本研究で解析した St-Photolyase の集光補因子結合サイトには、FAD (Flavin Adenin Dinucleotide) が結合していた (Fig. 6)。この St-Photolyase は、古細菌 S. Tokodaii から直接抽出したものではなく、 大腸菌を用いて人工的に発現させたものであるが、大腸菌由来 Ec-Photolyase は MTHF を集光補因 子として利用していることから、天然の St-Photolyase が MTHF を利用しているとは考えられない。 MTHF 以外には、8-HDF, FMN, FAD の三者が St-Photolyase の集光補因子として考えられる。これ ら3 つの化合物の構造上の相違点は、アデニン部位である。St-Photolyase の Tyr-45 と Tyr-341 は このアデニン部位をよく認識しており、これら2 つのチロシンは An-, Tt-photolyase では保存され ていないことから、St-Photolyase は FAD を特異的に認識していると考えられる (Fig. 7)。

An-Photolyase とピリミジン (チミン) ダイマーの複合体構造を基に、St-Photolyase のピリミジ ンダイマー認識モデルを構築した (Fig. 8)。An-Photolyase はピリミジンダイマーを photolyase で 広く保存された 4 残基 (Glu283<sub>An</sub>, Arg232<sub>An</sub>, Asn349<sub>An</sub>, Arg350<sub>An</sub>) で保持しているが、St-Photolyase ではこのうち一つの Asn349<sub>An</sub> が Gly309<sub>St</sub> に変異していた。代わりに An-Photolyase では 2 つの 水分子が占めていた位置に、St-Photolyase の Asn349<sub>St</sub> が存在した。





Fig. 7 Superimposition of the light harvesting cofactor of Anphotolyase (Cyan) and Stphotolyase (Dark yellow)

Fig. 8 Model Structure of pyrimidine dimer Black: Both, Cyan: An-photolyase, Dark yellow: St-photolyase

St-Photolyase は An-Photolyase とは若干異なった機構でピリミジンダイマーを保持すると示唆 される。

## Crystal Structure of archaeal photolyase with two FAD molecules

Masahiro Fujihashi Division of Chemistry, Graduate School of Science

UV exposure of DNA molecules induces serious DNA lesions. The cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs CPD-type-lesions by using the energy of visible light (Fig. 1). Crystal structures of three photolyases from *E. coli*, *A. nidulans and T. thermophilus* (Ec-, An-, and Tt-photolyases) have already been determined. However, no structural information is available on archaeal photolyase. We determined the crystal structure of photolyase from an acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7.

Photolyase from *S. Tokodaii* (St-photolyase) was overexpressed in *E. coli* and purified using Ni-NTA and Resource Q or Resource Iso columns. The photoreactive activity was checked as shown in Fig 2. Crystals were obtained using sodium nitrate as a precipitant (Fig. 3). Diffraction datasets were collected at NW12 in PF-AR and BL41XU in SPring-8. Phases were determined with a molecular replacement method using Photolyase from *T. thermophilus* HB8 (Tt-Photolyase: 1IQR) as a search model (Table 1).

The crystal structure of St-Photolyase (Fig. 4) is very similar to the known three photolyase structures. The superimposition of these molecules results in the R.M.S.D. of the C $\alpha$  atoms being 1.32 Å (384 C $\alpha$ ), 1.18 Å (387 C $\alpha$ ), and 1.48 Å (349 C $\alpha$ ) to Ec-, An-, and Tt-photolyases, respectively.

Photolyases are known to have two chromophores with independent roles to harvest the light energy and to catalyze the reaction. Flavin adenine dinucleotide (FAD) is used as a catalytic-cofactor in all known photolyases (Fig. 5). 5,10-methenyltetrahydrofolate (MTHF), 8-hydroxy-5-deazariboflavin (8-HDF) and flavin mononucleotide (FMN) are known to used as light-harvesting cofactors of Ec-, An- and Tt-photolyases, respectively (Fig. 5).

An FAD was unexpectedly identified at the position of the light-harvesting cofactor of Stphotolyase (Fig. 6). Since Ec-photolyase utilizes MTHF and the recombinant St-photolyase was expressed in *E. coli*, St-photolyase does not seem to utilize MTHF as a cofactor. 8-HDF, FMN and FAD remain as candidates. The biggest difference among these three chromophores are the adenine portion. Tyr45 and Tyr341 are not found in Tt- and An-Photolyase but in St-photolyase (Fig. 7). These two residue specifically recognize the adenine portion of the FAD molecule. These facts imply that Tt-photolyase utilizes FAD as a light-harvesting cofactor.

We have constructed a model structure of St-photolyase recognizing a thymine dimer based on the superimposition on An-photolyase complexed with a thymine dimer (1TEZ) (Fig. 8). Four residues of An-photolyase (Glu283<sub>An</sub>, Arg232<sub>An</sub>, Asn349<sub>An</sub>, and Arg350<sub>An</sub>) bind to the thymine dimer. One of the four residues, Asn349<sub>An</sub>, is replaced by Gly309<sub>St</sub> in St-photolyase. In addition, the position of the amine group of Asn349<sub>St</sub> of St-photolyase is occupied by two water molecules in An-photolyase.

St-photolyase might recognize CPD with a different geometry from that of An-photolyase.

#### **Publications**

 Crystal Structure of Archaeal Photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with Two FAD Molecules: Implication of a Novel Light-harvesting Cofactor; M. Fujihashi, N. Numoto, Y. Kobayashi, A. Mizushima, M. Tsujimura, A. Nakamura, Y. Kawarabayasi, K. Miki., *J. Mol. Biol.* (2007) 365, 903-910

## 遺伝子を用いたシステム生物化学---生物機能の解明と新技術の開発に関する基礎的研究

工学研究科 合成・生物化学専攻 代表者 若森 実 分担者 金井 保・山東 信介・王子田 彰夫 支援・助言担当 事業推進担当者 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。そこで昨年に引き続き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、神経伝達物質放出に関わる電位依存性カルシ ウムチャネルの新たな機能の解析、非修飾 RNA を用いた細胞内遺伝子センシング系の構築、ペ プチドタグー低分子蛍光プローブのペアを用いた細胞膜上の受容体の選択的蛍光標識に関する新 技術の開発を行った。

(1)遺伝子組換えを用いた超好熱菌水素関連代謝系の解析:超好熱菌 Thermococcus kodakaraensis はその生育に伴い水素を発生するが、同時にアラニンを排出する。ゲノム解析から予想される代 謝経路では、アラニンは Alanine aminotransferase (AlaAT) によるグルタミン酸からピルビン酸 へのアミノ基転移反応により生成する。一方、グルタミン酸の再生過程ではアンモニアと共に還 元力となる NADPH が必要である。本菌の細胞質型ヒドロゲナーゼ (Hyh) は水素を基質として NADPH を生成することから、発生した水素の一部は Hyh により再吸収され、アラニン生成に利 用されることが予想された。この仮説を確かめるために、本菌株のアラニン生成を抑制する遺伝 子破壊株を作成した。T. kodakaraensis KU216 株をホストに、AlaAT 遺伝子破壊株 (PAT1)、Hyh 遺伝子破壊株 (PHY1)、および両遺伝子破壊株 (DPHA1) を作製した。PHY1 株では、二酸化炭 素に対する水素の発生割合が上昇したことから、Hyh が水素の再吸収に関与していることを確 認した (Table 1)。一方、PAT1 株でも水素の発生割合が上昇したことから、本菌がアラニン生成

Strain	Description	H₂ rate (mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ratio	Alanine (mM)	NH <sub>3</sub> (mM)
KU216	Host strain	28.1	0.88	10.3	0.9
PHY1	Hyh knockout	28.8 (+0.7)	0.96 (+0.08)	8.3 (-2.0)	3.5 (+2.6)
PAT1	AlaAT knockout	29.3 (+1.2)	0.92 (+0.04)	8.0 (-2.3)	2.4 (+1.5)
DPHA1	Double knockout	31.0 (+2.9)	0.97 (+0.09)	7.4 (-3.9)	3.8 (+2.9)

Table 1 Comparison of metabolites of T. kodakaraensis

の還元力として水素を利用していることが示唆された。培養前後の培養上清中のアラニンとアン モニアの濃度変化を調べたところ、両破壊株共にアラニン濃度の減少およびアンモニア濃度の上 昇が見られた。これらの傾向は、両遺伝子破壊株においてさらに顕著であった。以上の結果は、 Hyh および AlaAT の両酵素が共通の代謝反応系に関与していることを示す。

(2) 前シナプスアクティブゾーンタンパク質による電位 依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルの機能修飾:シナプスに於いては、 神経伝達物質の充填されたシナプス小胞がシナプスの前 膜と融合する事により、伝達物質の放出(開口放出)が Active zones (AZs) と呼ばれる比較的電子密度の高い構造 体で起こる。この開口放出の引き金を引くのが電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルを介した細胞外からの Ca<sup>2+</sup> 流入であり、電 位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルと開口放出分子装置が AZ に高密 度に集積している。Ca<sup>2+</sup>チャネルがこの小胞の近くにな いと入った Ca<sup>2+</sup> が有効に開口放出を引き起こせない。一 方、シナプス後膜では電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルと AMPA 受容体が直接結合し伝達から伝導への情報の変換の効率 を上げている可能性を報告した。最近、森研究室では酵母 ツーハイブリッド法で Ca<sup>2+</sup> チャネルと相互作用する分子 を、脳のライブラリからスクリーニングした。このうち、 AZ に存在する分子を P/Q 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルと



Fig. 1 A, normalized currents. B, inactivation curves.

baby hamster kidney 細胞に発現させ機能解析した。能解析した。P/Q 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネル はこの AZ に存在する分子が存在しないと 2 秒間の 10 mV までの脱分極刺激で 100% 不活性化 してしまうが、この AZ に存在する分子が共存すると不活性化が著しく遅くなる (Fig 1A)。また、 不活性化の膜電位依存性もこの分子により脱分極側に約 30 mV 移動した (Fig 1B)。P/Q 型電位 依存性  $Ca^{2+}$  チャネルはこの AZ に存在する分子を介してシナプス小胞との距離を縮めるとともに  $Ca^{2+}$  流入を増やし神経伝達物質の放出を調節している可能性があることが判明した。

(3) 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 を用いた実施を前提としている。結果、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 適合型の遺伝子発現検出・診断手法が必須である。我々 は細胞機能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」系の構築に挑戦している。



Fig. 2

具体的には、Molecular Beacon 型へアピン構造を有する RNA プローブ (MB-mRNA) を設計、in vitro 系におけるコンセプトの実証・改良に成功した。また、細胞内応用に向けた in vivo セレクション系の構築を行なった。本セレクション系の実施により、遺伝子発現検出系の最適化に加え、細

胞内・外における核酸構造の相違に対する知見が得られるものと期待される。

(4) ペプチドタグー小分子プローブペ アによるタンパク質の特異的蛍光検 出:近年ペプチドタグー低分子蛍光プ ローブのペアが新しいバイオイメージ ングのツールとして注目されている。 我々はチロシンを基本骨格とする亜 鉛錯体 (Zn(II)-DpaTyr)が連続するア スパラギン酸配列 (Dn, n=2~5)と水 中で1:1で相互作用することを見い だした。Zn(II)-DpaTyrとの親和性は アスパラギン酸の数に依存し、4 つ連



Fig. 3 Specific labeling of D4 tagged protein with Zn(II)-DpaTyr probe

続したモデルペプチド (D4; DDDD) に対しては K<sub>d</sub> にして 1  $\mu$ M 程度であることを ITC 測定より 明らかにした。次に D<sub>4</sub> タグ配列を二つ (D<sub>4</sub>-G-D<sub>4</sub>) 有するタンパク質 RNase に対して親和性を評 価した。ITC 測定より D<sub>4</sub> 配列を二つ有する RNase と Zn(II)-DpaTyr を二つ連結した 4 核亜鉛錯 体との親和性は K<sub>d</sub> にして 55 nM であり、マルチバレントな効果により非常に強い相互作用が達 成されることを明らかとした。次に細胞外領域に繰り返し D<sub>4</sub> 配列 (D<sub>4</sub>-G-D<sub>4</sub>-G-D<sub>4</sub>) を有するムス カリン感受性アセチルコリンレセプター (m1AChR) を CHO 細胞上に発現させ、この細胞をフル オレセインおよびシアニンで蛍光色素修飾した四核 DpaTyr 亜鉛錯体で染色した。EGFP 連結型 の m1AChR を用いた多重標識、洗浄実験などの結果から亜鉛錯体型蛍光プローブが細胞表層の m1AChR を選択的に蛍光標識していることが明らかとなった。

## System biological chemistry --- Genetic and chemical approaches to understand and utilize the system of life

Minoru Wakamori, Tamotsu Kanai, Shinsuke Sando, Akio Ojida Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering

(1) Genetic analysis of metabolic pathway relating to  $H_2$  generation of a hyperthermophile: The hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 is an anaerobic heterotroph evolving molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) during growth. Based on the entire genome sequence of *T. kodakaraensis*, metabolic pathway of the strain relating to  $H_2$  generation was estimated. Moreover, improvement of the H<sub>2</sub>-production potential of *T. kodakaraensis* was achieved by the combined application of the genome information and the gene disruption system (Table 1).

(2) Impact of an active zone scaffolding protein on inactivation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel: Active zones (AZs) are highly specialized sites for release of neurotransmitter in presynaptic nerve terminals. The spacing between voltage-dependent calcium channels (VDCCs) and synaptic vesicles at AZs is thought to influence the dynamic properties of synaptic transmission. However, molecular determinants that maintain or regulate appropriate distance between vesicles and VDCCs have been elusive. Recently we have demonstrated a novel molecular interaction between an

AZ scaffolding protein and VDCCs. To elucidate the functional significance of this direct coupling, we characterized whole-cell Ba<sup>2+</sup> currents through recombinant P/Q-type VDCC expressed as  $\alpha_{1A} \alpha_2 / \delta \beta_{1a}$  complex in baby hamster kidney cells. The AZ protein induced a pronounced deceleration of inactivation rate (Fig. 1A) and a depolarizing shift of the inactivation curve (Fig. 1B). Currents evoked by trains of action potential waveforms, a more physiological voltage-clamp protocol used particularly to reveal closed-state inactivation, further support profound suppression of voltage-dependent inactivation by the AZ protein. Thus, the AZ protein coordinates calcium signaling and spatial organization of molecular constituents in presynaptic AZ.

(3) Effort toward *in vivo* genotyping using genetically-encodable unmodified mRNA as a probe: We developed a new strategy of Molecular Beacon-mRNA for sensitive genotyping and nucleic acid detection, based on the system of naturally occurring or engineered hairpin-shaped RNAs for conformation-induced control of translation frequency. The sensing of nucleotide sequence can be carried out using a genetically encodable unmodified mRNA as a probe.

(4) Peptide tag-small probe pair: A new protein labeling method for bioimaging: We developed a new peptide tag/artificial probe pair composed of a genetically encodable oligo-aspartate sequence (D4-tag) and a corresponding multi-nuclear Zn(II) complexes (Zn(II)-DpaTyrs). The strong binding affinity of the Zn(II)-DpaTyr probes with the D4-tag was achieved by the multiple coordination bonds and the multivalent effect. It was measured quantitatively by ITC. The high affinity between the tag and the probe enabled the pair to be used for the labeling and fluorescence imaging of a membrane-bound receptor protein tethering a triply repeated D4-tag ((D4)<sub>3</sub>) in living cells.

### **Publications**

- 1. Complete genome analysis and gene disruption of the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* and its application for hydrogen production, T. Imanaka, H. Atomi, T. Fukui, T. Kanai, *Proc. Int. Symp. Extremophiles Appli.*, (2006), in press.
- 2. A functional AMPA receptor-calcium channel complex in the postsynaptic membrane, MG. Kang, CC. Chen, M. Wakamori, Y. Hara, Y. Mori, KP. Campbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5561-5566 (2006).
- 3. Visible sensing of nucleic acid sequences with a genetically encodable unmodified RNA probe, A. Narita, K. Okawa, S. Sando, Y. Aoyama *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 2879-2883 (2006).
- 4. Oligo-Asp tag/Zn(II)-complex probe as a new pair for labeling and fluorescence imaging of proteins, A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10452-10459 (2006).

### 極限環境下での新物質・物性

理学研究科 化学専攻 中西 和樹・奥山 弘・前里 光彦・道岡 千城 支援・助言担当 事業推進担当者 有賀 哲也・齋藤 軍治・吉村 一良



(1) 水素結合性側鎖をもつ高分子とゾルーゲル法シリカの相分離(中西):ケイ素アルコキシドの加水分解重合過程で相分離とゾルーゲル転移を並行して誘起すると、マクロ孔およびメソ孔をもつシリカゲルが得られる。共存させる水溶性高分子や界面活性剤の種類や濃度によって相分離とゲル化の速度を調節し、さまざまなモルフォロジーを得ることができる。ケイ素アルコキシドとして Tetramethoxysilane (TMOS)を、水溶性高分子としてシリカと相互作用の強いPolyacrylamide (PAAm)を用いた系の相分離の挙動を調べた。

実験: 0.5M 硝酸・TMOS (信越シリコーン LS-540)・PAAm (平均分子量 10,000 Aldrich) の 3 成 分を氷冷下で加水分解・重縮合開始させ、40℃で静置してゲル化させた。得られたゲルはエタノー ルで溶媒交換した後 40℃で乾燥させ、さらに 570℃で 6 時間熱処理を行った。SEM、FE-SEM、 窒素吸着測定、TG-DTA により、多孔構造の観察・測定を行った。

結果と考察:特定の範囲においてシリカゲル骨格とマクロ孔が互いに絡み合った共連続構造を得た。熱処理後のサンプルはサブミクロン領域を中心とするマクロ孔構造をもち、PAAmの濃度が高いほど細孔径は増大することから、PAAmは相分離誘起成分として作用することがわかった。 PAAmはシリカゲル重合体に水素結合してゲル網目を分子レベルで修飾しており、溶媒置換処理によってPAAmの膨潤状態を変化させることによって、乾燥・熱処理後のメソ構造分布が大きく異なることが明らかになった。

(2) 固体表面に吸着した単一分子の研究(奥山):低次元場を 有する固体表面の物性研究の特色は、表面特有の新物質相が 得られることに加え、顕微鏡法により直接「観る」ことが可能 な点にある。走査トンネル顕微鏡(STM)の原子分解能は個々 の原子の観察に留まらず、原子操作や単一分子の分光などに 応用される。本研究では銅表面に吸着したアセチレン単分子 の研究を行い、単原子を扱う技術の確立を目的とした。

(2)-1 単一アセチレン分子の振動分光: Cu(110) 表面に吸着したアセチレン分子の真上に STM 探針を固定し電圧を走査することで、非弾性トンネル分光 (STM-IETS) を測定した(図 1)。 挿入図はアセチレン分子の STM 像を示す。0.35 V に観測さ



 $\boxtimes$  1 STM-IETS spectra obtained from C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> and C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> on Cu(110).

れたのは C-H 伸縮振動であり、重水素置換したアセチレンでは同位体シフトが観測されている。 両者は STM 像では全く区別が付かないが、振動分光により明瞭に特定される。また振動エネル ギーからアセチレンの~ *sp*<sup>3</sup> 再混成が認められ、原子レベルの化学分析手法として、その有効性 を示している。

(2)-2 単一アセチレン分子の電子誘起運動:アセチレン分子にトンネル電子を注入することにより、サイト間のホッピングが誘起された。トンネル電子のエネルギーの閾値は C-H 伸縮振動エネルギーと相関していること、1 電子過程であることなどを示した。

(3)  $\pi$ -d 複合磁性伝導体の巨大磁気抵抗(前里):分子性伝導体に磁性イオンを導入し、磁場や電 場などによる巨大な応答や $\pi$ -d相互作用による新規な電子物性の発現を目指した。ヨウ素置換 ドナー分子 DIETSe と局在スピン(S=5/2)をもつ含遷移金属アニオン FeCl4 からなる $\pi$ -d複合系 (DIETSe)<sub>2</sub>FeCl4 の物性測定を行った。この物質は擬一次元電子系をもつ金属であり、約12 K 以 下で半導体に転移する。さらに約 2.5 K で Fe スピンの反強磁性転移が観測され、その温度で抵 抗の温度依存性にも異常が現れた。さらに 1.5 K で Fe スピンの磁気容易軸方向へ磁場を加えて 磁気抵抗測定を行ったところ、スピンフロップ磁場の直上で磁気抵抗が急激に変化することを見 出した。この抵抗変化は静水圧下で非常に大きくなり、12 kbar では約 130%という巨大な磁気 抵抗変化を示した。また、静水圧印加は約 12 K の金属 - 半導体転移を抑制するが、約 2.5 K 付 近の抵抗異常は高圧下でも観測された。 $\pi$ 電子系は圧力に敏感で金属状態が安定化するが、Fe<sup>3+</sup> の磁気転移は圧力に鈍感である事が分かった。 $\pi$ 電子系の基底状態はスピン密度波(SDW)状態 である可能性が考えられ、SDW と Fe<sup>3+</sup>の反強磁性秩序との相関が得意な伝導機構に寄与してい ると考えられる。(理化学研究所の今久保達郎博士との共同研究)

(4) 水分子が挿入されたコバルト酸化物超伝導体のスピンダイナミクス(道岡):ナトリウムが挿入されたコバルト酸化物 Na<sub>0.7</sub>CoO<sub>2</sub> は良い熱電材料となる可能性のあることから注目されている。 また Na<sub>0.7</sub>CoO<sub>2</sub> にさらに水分子層 2 層が挿入された Na<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub>・yH<sub>2</sub>O (BLH) は様々な実験から、 擬二次元三角格子を形成する CoO<sub>2</sub> 層上で異方的超伝導体となっていると理解され興味深い。本 研究では合成条件を試行錯誤した結果、ナトリウムの量 x や水の量 y の異なると考えられる BLH を創生し、超伝導転移温度の制御に成功した。またそのような試料の中から超伝導体とならずに 低温で磁気相転移を示す物質の合成条件を明らかにした。これらの試料を <sup>59</sup>Co 核における核四 重極共鳴 (NQR) により研究したところ、共鳴周波数が大きくなるほど核スピン - 格子緩和率で

プローブした磁気揺らぎが強くなることが明らかに なった。そのとき超伝導転移温度は磁気揺らぎが強く なるにつれて上昇し、最大値 4.8 K を示したあと急激 に減少し、磁気秩序相に移ることがわかった。つまり 超伝導のクーパー対の形成に磁気揺らぎが寄与してい ると考えられ、強い磁気揺らぎは超伝導を阻害し磁気 秩序を示すと考えられる。図 2 に超伝導転移温度が異 なる BLH と、報告されている Na<sub>0.7</sub>CoO<sub>2</sub> の <sup>23</sup>Na 核の 核スピン - 格子緩和率  $1/^{23}T_1$ の温度変化を示す。 $1/^{23}T_1$ は 100 K 以上の高温でナトリウムの運動に関係した異 常が見られ、50 K 以下では磁気揺らぎに依存した非 コリンハ的な挙動が見られる。 $1/^{23}T_1$ の絶対値は大き く異なるものの低温での温度に対して冪的な挙動(~  $T^{0.7}$ )は全ての試料で一致し、それぞれの CoO<sub>2</sub> 面での 磁気揺らぎは似ていると考えられる。Na<sub>0.7</sub>CoO<sub>2</sub> は非



 $\boxtimes$  2 <sup>23</sup>Na nuclear spin-lattice relaxation rate  $1/^{23}T_1$  against temperature for Na<sub>0.7</sub>CoO<sub>2</sub> (by Ihara et. al.) and BLHs.

弾性中性子線による研究から面内で強磁性的、面間で反強磁性的な磁気揺らぎであるAタイプ 揺らぎをもつことが知られており、Na<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub>・yH<sub>2</sub>O系の超伝導はAタイプ揺らぎの量子臨界点 の近傍で起きていると考えられる。

## Research of novel materials and properties in extreme environments

Kazuki Nakanishi, Hiroshi Okuyama, Mitsuhiko Maesato, Chishiro Michioka Division of Chemistry, Graduate School of Science

(1) Phase separation in silica sol-gel system incorporated with a polymer having hydrogenbonding side-chains (Nakanishi): Silica gels with controlled macro/mesopores can be prepared by a sol-gel process incorporated with an additive to induce phase separation. Using tetramethoxysilane (TMOS) as a silica source and poly(arylamide) (PAAm: MW-10,000) as a phase-separation inducer, the reaction solution was prepared by hydrolyzing TMOS under an acidic condition, then allowed to gel in a sealed container at 40 °C. In a limited starting composition region, macroporous gels with co-continuous pores and gel skeletons were obtained. PAAm was preferentially distributed to the phase rich in silica oligomers and it was also found that the solvent exchange treatment can modify the mesopore structure of heat-treated silica gels through swelling control of PAAm chains closely hybridized with silica network.

## (2) Single-molecule study of an adsorbate on surface (Okuyama):

(2)-1 Single-molecule vibrational spectroscopy: Inelastic electron tunneling in the STM junction realizes vibrational spectroscopy of a single molecule. Figure shows the STM-IETS spectra for an acetylene molecule on Cu(110). The 0.35 V peak shows the C-H stretch mode. Isotope shift is observed by substitution with deuterium. The vibrational energy indicates that acetylene is rehybridized to nearly  $sp^3$  on Cu(110).

(2)-2 Single-molecule hopping induced by tunneling electron: STM can be used as a atomicscale reactor with energetic tunnel electron. The hopping of an acetylene molecule is induced by the energetic electrons that excite the C-H stretch mode, followed by anharmonic coupling to the lowenergy translational modes.

(3) Giant magnetoresistance in a  $\pi$ -d hybrid magnetic conductor (Maesato): We have investigated the magneto-transport properties of the magnetic molecular conductor (DIETSe)<sub>2</sub>FeCl<sub>4</sub>. This salt has both the quasi-one dimensional electronic structure and local moments of anions, where the interplay between the low-dimensional  $\pi$ -electron system and *d*-spins is expected. At ambient pressure this salt shows metallic behavior down to about 12 K, below which the resistance increases with decreasing the temperature. An anitiferromagnetic (AF) transition of Fe(III) (S = 5/2) spins occurs at about 2.5 K, where an additional anomaly are observed in the temperature dependence of resistance. Below 2.5 K, we found the quite anomalous magnetoresistance: The interlayer magnetoresistance showed an abrupt change just above the spin-flop field. The resistance change becomes very large with increasing the hydrostatic pressure and reached to about 130 % at 1.5 K and 12 kbar. These results suggest the strong spin-charge coupling in this novel  $\pi$ -*d* conductor. (4) Spin dynamics in the water intercalated cobalt oxide superconductor (Michioka): A novel superconductor of Na<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub> · yH<sub>2</sub>O (BLH) can be synthesized from the parent compound Na<sub>0.7</sub>CoO<sub>2</sub>. In this study, we performed <sup>23</sup>Na NMR studies of the powder samples of Na<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub> · yH<sub>2</sub>O with superconducting transition temperature of Tc < 1.8 K, 3 K and 4.5 K. The temperature dependence of <sup>23</sup>Na nuclear spin-lattice relaxation rate  $1/^{23}T_1$  of the non-superconducting BLH (Tc < 1.8 K) is found to be similar to that of the parent compound Na<sub>0.7</sub>CoO<sub>2</sub>, whose spin dynamics is understood by A-type (intra-layer ferromagnetic and inter-layer antiferromagnetic) spin fluctuations. The superconducting phase is located to the quantum critical point with A-type magnetic instability.

#### **Publications**

- 1. Sol-gel Process of Oxides Accompanied by Phase Separation, K. Nakanishi, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* (Account), **79**, 673-691 (2006).
- New organic conductors based on dibromo- and diiodo-TSeFs with magnetic and non-magnetic MX4 counter anions (M = Fe, Ga; X = Cl, Br), T. Shirahata, M. Kibune, M. Maesato, T. Kawashima, G. Saito, T. Imakubo, *J. Mater. Chem.*, 16, 3381-3390 (2006)
- Emergence of inhomogeneous moments from spin liquid in .the triangular-lattice Mott insulator κ -(ET)<sub>2</sub>Cu<sub>2</sub>(CN)<sub>3</sub>, Y. Shimizu, K. Miyagawa, K. Kanoda, M. Maesato, G. Saito, *Phys. Rev.*, B73, 140407(R)-1/140407(R)-4 (2006)
- Anomalous Magnetoresistance in the π -d System (DIETSe)<sub>2</sub>FeCl<sub>4</sub>, M. Maesato, T. Kawashima, G. Saito, M. Kibune, T. Shirahata, T. Imakubo, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 455, 123-127 (2006).
- 5. Organic superconductors, G. Saito, M. Maesato, Mol. Cryst. Liq. Cryst., 455, 31-46 (2006).
- Preparation of Superconducting (TMTSF)<sub>2</sub>NbF<sub>6</sub> by Electrooxidation of TMTSF Using Ionic Liquid as Electrolyte, M. Sakata, Y. Yoshida, M. Maesato, G. Saito, K. Matsumoto, R. Hagiwara, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 452, 103-112 (2006).
- 7. 有機伝導体 κ-(ET)<sub>2</sub>X のスピン液体と超伝導 キャリアードーピング、バンド幅・バンドの異方 性制御 —, 前里光彦, 齋藤軍治, 物性研究, **87-2**, 201-213 (2006).
- 8. <sup>23</sup>Na NMR study of non-superconducting double-layer hydrate Na<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub> · *y*H<sub>2</sub>O, H. Ohta, Y. Itoh, C. Michioka and K. Yoshimura, *Physica C*, **445-448**, 69-72 (2006).
- <sup>59</sup>Co nuclear quadrupole resonance studies of superconducting and nonsuperconducting bilayer water intercalated sodium cobalt oxides Na<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub> • yH<sub>2</sub>O, C. Michioka, H. Ohta, Y. Itoh and K. Yoshimura, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **75**, 063701-063704 (2006).
- Knight shift of triangular lattice superconductor Na<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub> yH<sub>2</sub>O, C. Michioka, H. Ohta, Y. Itoh, K. Yoshimura, M. Kato, H. Sakurai, E. Takatyama-Muromachi, K. Takada and T. Sasaki, *Physica B-Condensed Matter*, **378-380**, 628-629 (2006).
- Possible spin triplet superconductivity in Na<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub> *y*H<sub>2</sub>O -<sup>59</sup>Co NMR studies, M. Kato, C. Michioka, T. Waki, Y. Itoh, K. Yoshimura, K. Ishida, H. Sakurai, E. Takatyama-Muromachi, K. Takada and T. Sasaki, *J. phys.- Condensed Matter*, **18**, 669-682 (2006).

#### 新規物性機能探求

## 二酸化炭素を利用した選択的分子変換



工学研究科 分子工学専攻 宍戸 哲也

(1) 二酸化炭素を利用した酸化的脱水素反応:現在、石油化学工業の重要な基幹原料であるエチ レン、プロピレン等のアルケンは、主にナフサ等のスチームクラッキングあるいは対応するアル カンの単純脱水素によって製造されている。しかし、単純脱水素反応は平衡的に不利な反応であ り高い反応温度を必要とする (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub> → C<sub>3</sub>H<sub>6</sub> + H<sub>2</sub>)。一方、触媒を用いた酸素による酸化的脱水素 反応 ( $C_{3}H_{8} + 1/2O_{2} \rightarrow C_{3}H_{6} + H_{2}O$ ) は、低温で行われるため省エネルギープロセスが構築できる 可能性があるが、酸素共存下では完全酸化反応が併発するためアルケン選択率が低下する問題が ある。このため、高いアルケン選択率を得るためにはアルカン転化率を低く抑えることが必要で ある。我々は、二酸化炭素を穏和な酸化剤としてアルカンの脱水素反応を検討した。二酸化炭素 共存下での脱水素反応 (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub> + CO<sub>2</sub> → C<sub>3</sub>H<sub>6</sub> + CO + H<sub>2</sub>O) では完全酸化反応が進行せず、高いア ルケン選択率、収率が得られる。加えて地球温暖化の原因である二酸化炭素の化学的利用として も興味深い。我々は、均一な細孔径 (2-10 nm) と大きな比表面積 (1000 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> 程度) を持つ代表的 なメソポーラスシリカである MCM-41 にクロムオキソ種を導入した Cr-MCM-41 を調製し、二 酸化炭素を酸化剤としたエタン、プロパン、イソブタンの酸化的脱水素反応について検討を行っ た。Cr-MCM-41 および細孔を持たないシリカである Cab-O-Sil にクロムを担持した Cr/Cab-O-Silの触媒機能とクロムオキソ種の局所構造との関連や触媒活性サイトの酸化還元挙動を検討し た結果について述べる。

(2) Cr 種の局所構造と活性との関連: Cr-MCM-41 をエタン、プロパン、イソブタン、エチルベンゼンの脱水素反応に用いたところ、いずれの場合でも二酸化炭素の存在によって脱水素反応が促進された。Cr-MCM-41 によるプロパン脱水素反応の経時変化を検討したところ、二酸化炭素の

有無に関わらず、反応時間の経過とともに活性は低下する傾向が認められた(図2)。活性低下の要因として反応中の炭素 析出や、活性サイトであるクロム種の構造や配位環境の変化 が考えられる。反応後の触媒に析出した炭素量を測定したと ころ、二酸化炭素共存下で反応を行った場合の方が、非共存 下で行った場合よりも炭素析出量が大きいことが分かった。 また、二酸化炭素のみを触媒に接触させても、反応温度であ る 823 K では、触媒表面に析出した炭素質を除去できないこ とが分かった。この結果は、炭素質の除去には、二酸化炭素 の寄与が小さいことを示唆している。従って、Cr-MCM-41 への炭素析出が活性低下の主要な要因ではなく、クロム種の 構造や配位環境の変化が強く影響していると考えられる。図 1 に Cr 担持量が等しい Cr-MCM-41 と Cr/Cab-O-Sil につい



Fig. 1 Dehydrogenation of C<sub>3</sub>H<sub>8</sub> over Cr-MCM-41 (●) and Cr/Cab-O-Sil (▲)

て反応開始3時間後に酸素処理を行った後、再び反応を行った結果を示す。両者とも基本的に は、シリカ上にCrオキソ種が分散した触媒であるにも関わらず、両者の挙動は大きく異なって いる。即ち、Cr-MCM-41では、活性は反応初期のレベルにまで回復するのに対して、Cr/Cab-O-Silでは全く活性の回復は認められない。酸素処理を行うことにより炭素質は燃焼除去されてい ることから炭素析出は、Cr/Cab-O-Silの活性が酸素処理後に回復しない要因ではないと考えられ る。Cr-MCM-41では、反応中の活性低下および酸素処理による活性の回復は繰り返し可逆的に 進行した。

XRD および窒素吸着測定の結果から Cr-MCM-41 は、MCM-41 の六方構造を保持 していることが分かった。また、XRD パ ターンでクロム酸化物種の回折ピークが観 測されないことからクロム種は、高分散担 持されていると考えられる。図2に反応中 の任意の時間における Cr-MCM-41 の Cr-K 殻 XAFS スペクトルを示す。

反応前の Cr-MCM-41 では、XANES ス ペクトルに四配位構造に特有のシャープな プリエッジピークが観測され、吸収端の位 置から Cr<sup>6+</sup>が存在していることが分かった。 この強いプリエッジピークは、1s-3d 遷移 に帰属される。1s-3d 遷移は双極子禁制遷 移であるが、配位環境が対称的な六配位八



Fig. 2 Cr K-edge XAFS spectra of Cr-MCM-41 (Si/Cr=50)

面体構造から歪むと3d-4p 軌道の混成が生じて遷移が許容されるようになる。また、動径構造関 数に相当する EXAFS のフーリエ変換スペクトルにおいて 1.4 Å 付近に Cr-O に対応する第一ピー クが確認されるが、2.0 Å 以上の位置にピークが確認されないことから Cr<sup>6+</sup> が高分散状態にあり、 隣接する Cr<sup>6+</sup> 種が存在していないことが確認された。カーブカーブフィッティングの結果、Cr は、なる歪んだ四配位構造で存在していることが分かった。反応開始 0.5 時間後の Cr-MCM-41 の XANES スペクトルではプリエッジピークの強度が顕著に低下し、吸収端の位置から Cr<sup>6+</sup> から Cr<sup>3+</sup> への還元が進行したことがわかった。EXAFS のフーリエ変換スペクトルでは、1.4 Å 付近に Cr-O に対応する第一ピークが確認され、カーブフィッティングの結果から Cr 酸化物種は、六配 位構造へ変化したことがわかった。さらに反応時間が経過しても XANES スペクトルの大きな変 化は認められないが、EXAFS のフーリエ変換スペクトルでは、反応時間の経過に伴い 2.7 Å 付近 に Cr-Cr に対応するピークが成長していており、この結果は、反応中に六配位 Cr 種の凝集が進行 し Cr 酸化物クラスターが生成したことを示している。しかし、反応5 時間後においても XRD パター ンにはクロム酸化物種の回折ピークが観測されないことから、その結晶子サイズはそれほど大き くなく 50 Å 以下であると推定される。

(3)時間分解 XAFS 測定による Cr 種の局所構造変化の解析:現在、反応条件下における Cr 種の局所構造の変化を時間分解 XAFS 測定(筑波 KEK-PF AR-NM2A)による解析を進めている。 最近の時間分解 XAFS 測定は、湾曲分光結晶を用いたエネルギー分散型 XAFS 装置を用いてミ リ秒の時間分解能での測定が可能である。時間分解 XAFS 測定の結果からは、反応の極初期1分 以内に Cr<sup>6+</sup> 四配位種は、Cr<sup>3+</sup> 六配位種へと変化し、反応が定常的に進行している間は、ほぼ Cr 種は、Cr<sup>3+</sup> 六配位種として存在していることが示唆された。また、酸素処理による Cr<sup>3+</sup> 六配位種 から Cr<sup>6+</sup> 四配位種への変化の速度は、還元の速度よりも若干遅いものの数分以内にすべての Cr<sup>3+</sup> 六配位種が Cr<sup>6+</sup> 四配位種へ変化することが明らかとなった。

## Cr-MCM-41 for selective dehydrogenation of lower alkanes with carbon dioxide

Tetsuya Shishido Division of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering

(1) Dehydrogenation of lower alkanes with carbon dioxide: Catalytic conversions of alkanes into the corresponding alkenes are of increasing importance because of the growing demand for alkenes. Chromium-based catalysts have received much attention because of their wide use in many catalytic reactions. Silica- and alumina supported chromium oxides were industrially used for the productions of lower alkenes such as ethene, propene, and isobutene through the dehydrogenation of the corresponding alkanes. The reaction is endothermic and inevitably controlled by the thermodynamic equilibrium, requiring substantial energy consumption. Supported chromium oxides have also been investigated for the oxidative dehydrogenation of lower alkanes or oxidation of other organic compounds with oxygen. However, the use of oxygen as an oxidant is frequently accompanied by deep oxidation, resulting in a decrease in product selectivity. Carbon dioxide as one of the major greenhouse gases has recently been considered as a source of carbon. Catalytic dehydrogenation of carbon dioxide into several organic compounds has been intensively studied. In fact, carbon dioxide can also act as a mild oxidant and utilization of carbon dioxide in some partial oxidation reactions, such as CO<sub>2</sub> reforming of methane and oxidative coupling of methane, has been reported. Carbon dioxide was found to enhance the dehydrogenation of ethane, propane, and isobutane over supported chromium oxide. The reduction-oxidation property and the appropriate dispersion of chromium species on the support are important in these catalytic reactions.

MCM-41, a typical mesoporous molecular sieve, possesses uniform and well-ordered mesoporous channels with controllable pore sizes from 2 to 10 nm as well as a high surface area (ca. 1000 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), and thus could be used as a promising catalyst support. Studies of chromium species introduced into MCM-41 would thus be useful in developing Cr-containing catalysts with desirable catalytic properties. There exist several studies on the synthesis and were characterization of Cr-MCM-41. Cr-MCM-41 prepared by an impregnation method was once used for the oxidative dehydrogenation of propane with oxygen, but the selectivity to propene was low and the yield to propene was lower than 5%. Recently, a SBA-15-supported chromium oxide by the impregnation method has been applied to the dehydrogenation and the oxidative dehydrogenation of propane and showed good catalytic performance.

In this study, we report the deactivation behavior of Cr-MCM-41 prepared by direct hydrothermal method in the dehydrogenation of propane by carbon dioxide. The catalysts before and after the reaction are characterized in detail to obtain information about the change in structures and coordination environments of the introduced chromium species during the reaction. Moreover regeneration of the deactivated catalyst by oxygen or carbon dioxide is investigated and discussed to elucidate the structure–activity relationships for the Cr-MCM-41 prepared by direct hydrothermal method catalysts.

(2) Dehydrogenation of lower alkanes with carbon dioxide: M-MCM-41 catalysts (M: V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, and Ga) prepared by direct hydrothermal (DHT) synthesis have been tested for dehydrogenation of propane with carbon dioxide. The synthesized materials were characterized by X-ray diffraction (XRD), N<sub>2</sub> adsorption (77 K), diffuse reflectance UV–vis, UV-Raman, and X-ray

absorption (XANES and EXAFS) spectroscopic measurements. Cr-MCM-41 showed the highest activity among M-MCM-41 catalysts tested, resulting in the production of propene with a conversion of 30% and a selectivity above 90%. The rate of carbon monoxide formation increased together with that of propene, while the rate of hydrogen formation stayed at almost constant value, with increasing the partial pressure of carbon dioxide. The mechanism of catalyst deactivation as well as regeneration was discussed based on the structure-catalytic property relationships. It is suggested that Cr(VI) in tetrahedral coordination formed as an active monochromate species and reduced to Cr(III) in octahedral coordination as a less active polychromate species during the reaction. Deactivated catalyst was regenerated by a treatment with gaseous oxygen, during which a reoxidation of the Cr(III) species to the Cr(VI) species was observed. Not only oxygen but also carbon dioxide could regenerate Cr(VI)O4 tetrahedra from reduced Cr(III)O6 octahedra, even though the efficiency of carbon dioxide was lower than that of oxygen. It is concluded that during the reaction propane is dehydrogenated to propene by Cr(IV)O<sub>4</sub> tetrahedra, which is simultaneously reduced to Cr(III)O<sub>6</sub> octahedra. The reduced  $Cr(III)O_6$  octahedra can be reoxidized to  $Cr(VI)O_4$  tetrahedra by carbon dioxide, and thus the reduction -oxidation cycle between  $Cr(VI)O_4$  tetrahedra and  $Cr(III)O_6$  octahedra has an important role in the dehydrogenation of propane with carbon dioxide over Cr-MCM-41.

#### **Publications**

- 1. Cr-MCM-41 for selective dehydrogenation of lower alkanes with carbon dioxide, Y. Wang, Y. Ohishi, T. Shishido, Q. Zhang, and K. Takehira, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 2003, **146**, 725-728.
- 2. Characterizations and catalytic properties of Cr-MCM-41 prepared by direct hydrothermal synthesis and template-ion exchange, Y. Wang, Y. Ohishi, T. Shishido, Q. Zhang, W. Yang, Q. Guo, H. Wan, K. Takehira, *Journal of Catalysis*, 2003, **220**, 347-357.
- 3. Behavior of active sites on Cr-MCM-41 catalysts during the dehydrogenation of propane with CO<sub>2</sub>, K. Takehira, Y. Ohishi, T. Shishido, T. Kawabata, K. Takaki, Q. Zhang, and Y. Wang, *Journal of Catalysis*, 2004, **224**, 404-416

## 析分子分光シミュレーターの開発



理学研究科 化学専攻 金 賢得 安藤 耕司 谷村 吉隆

(1) 分子間または分子内相互作用のある系の多次元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、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。本研究のターゲットはタンパク質などの生化学分子と二量体分子である。分子 中には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分子間の距離 rag 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<sub>AB</sub>)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が、本研究で得られた結果を 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 は双極子ー双極子相互作用と双極子ー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できることが可能であることを示した。特に、双極子ー双極子相互作 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<sub>AB</sub>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。さらに、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プログラ ムを web 上で公開している。

(2) 光合成アンテナなどの分子凝集体における超高速量子コヒーレント輸送:近年、レーザー技術の発達や普及によって、超高速時間領域における様々な分子世界の現象が解明されつつある。 特に、光合成の反応中心における電子励起状態(Exciton)の輸送現象は、光合成反応の中心的役 割を担う重要な現象として注目に値する。これまで Exciton-Exciton 輸送現象としては、密度演 算子における左右が同じ状態である Population 状態の輸送が主な研究の対象であった。しかし、 最近の非線形 Spectroscopy 実験技術の発展に伴い、より速い時間領域での測定が可能になった今、 Population 輸送だけでなく Coherent 状態(=密度演算子の左右が同一状態でない状態)の輸送が 観測で見えていても不思議ではない。本研究の目的はこのような新たな輸送現象である Exciton-Exciton Coherent 輸送に関して、その理論的な枠組みを構築し、実際に非線形 Spectroscopy 実 験で予測される結果やその解釈を提示することにある。Exciton-Exciton Coherent 輸送を扱う ためには、まず従来の Population 輸送を議論するとき使われていた射影演算子の理論体系を Population 状態ではなく、Coherent 状態に対応したものになるように再構築する必要がある。本 研究では Doorway-Window 関数の表示方法を用いて、非線形 Spectroscopy の実験で観測可能な 物理量である非線形応答関数の表式を Exciton-Exciton Coherent 輸送がある場合について導出し たい。Exciton-Exciton Coherent 輸送の時間発展は Population 状態のそれとは大きく異なる Non-Markovian 方程式に従うため、この Non-Markovian 方程式も新たに導出を試みたい。最終的には Exciton-Exciton Coherent 輸送が実際の実験の観測量にどのような影響を与え、どのように出現 するかまでを提示したい。

## **Research of functional organic material**

Yoshitaka Tanimura, Koji Ando and Kim Hyeon-Deuk Division of Chemistry, Graduate School of Science

(1) 2-Dimentional IR Spectroscopy of Inter- and Intra-molecular interaction: We present an analytical expression for the linear and nonlinear infrared spectra of interacting molecular vibrational motions. Each of the molecular modes is explicitly represented by a classical damped oscillator on an anharmonic multidimensional potential-energy surface. The two essential interactions, the dipoledipole(DD) and the dipole-induced-dipole(DID) interactions, are taken into account, and each dipole moment and polarizability are expanded to nonlinear order with respect to the nuclear vibrational coordinate. Our analytical treatment leads to expressions for the contributions of anharmonicity, DD and DID interactions, and the nonlinearity of dipole moments and polarizability elements to the one-, two- and three-dimensional spectra as separated terms, which allows us to discuss the relative importance of these respective contributions. We can calculate multi-dimensional signals for various configurations of molecules interacting through DD and DID interactions for different material parameters over the whole range of frequency. We demonstrate that contributions from the DD and DID interactions and anharmonicity are separately detectable through the third-order threedimensional IR spectroscopy, whereas they cannot be distinguished from each other in either the linear or the second-order IR spectroscopies. The possibility of obtaining the intra- or inter-molecular structural information from multi-dimensional spectra is also discussed.

(2) Exciton-Exciton Coherent Transfer: We have developed the explicit non-Markovian equation which can describe exciton-exciton coherent transfer(EECT). Its solutions make it possible to derive the effects caused by EECT in the nonlinear response function for four-wave-mixing experiments. We take into account ground and two-exciton states, static disorder and a phonon bath coupling represented by arbitrary spectral densities. Our derivation is based on the doorway-window representation and the projection operator method which are now developed for exciton-exciton coherent states. Applications of our analytical expression to B850 monomers of a Light harvest II(LH2) antenna system are mentioned. We have shown that EECT becomes indispensable and generates the essential contribution to the nonlinear spectroscopic signals in the molecular aggregates.

#### **Publications**

1. Multidimensional Infrared Spectroscopy for Molecular Vibrational Modes with Dipolar Interactions, Anharmonicity, and Nonlinearity of Dipole Moments and Polarizability, Kim Hyeon-Deuk and Yoshitaka Tanimura [J. Chem. Phys. Vol.123 224310(2005)]

## 高速走査高感度顕微分光法の開発と光合成膜研究への応用



理学研究科 化学専攻 熊崎 茂一 支援・助言担当 事業推進担当者 寺嶋 正秀

**背景** 植物に代表される酸素発生型光合成膜が環境変化に応じて膜内在色素タンパク複合体(系 1、系2、アンテナ複合体(フィコビリゾーム(PBS)等))の構成比や膜形態を調節することは主 に電子顕微鏡を用いた研究で知られてきた。しかし、これまでの研究では、光合成膜の応答性が マクロ光学的計測に基いて平均値で議論され、光合成膜構造変化の直接観察は不十分であった。 確かに従来の光学顕微鏡の解像力では膜の微細構造まで直接見るには不十分だったからである。 一方、申請者は低侵襲で3次元(空間分解能は0.4x0.2x0.4µm)の各極微領域の蛍光スペクトルを 高速取得できる顕微分光装置を独自の設計で完成させ(図1参照)、それを植物型光合成を行う シアノバクテリア(藍藻)、緑藻、植物に適用する研究を開始した。結果、3次元極微領域蛍光ス ペクトル観察でなければ識別できない幾つかの現象を見出している。これらは過去の光合成膜研 究で見過ごされてきた諸現象で、今後はより分子生物学的な解明が必要となるが、本稿ではその 一部の解析結果と考察を報告する。



図1 独自の考案で自主開発したラインスキャン半共焦点スペクトル顕微鏡 左から、顕微鏡模式図、糸状シアノバクテリア画像、近赤外レーザーによるライン走査領域の反 射像、ライン走査領域からの全ての蛍光が CCD カメラによって、横軸波長、縦軸空間座標で捉 えられた様子。 結果と考察 図2の画像はシアノバクテリアの一種アナベナで、二光子励起蛍光スペクトルを3次元各点で得た後、フィコビリゾーム (PBS) と系2の蛍光比率を3次元各点で表示している(系2蛍光/PBS 蛍光)。虹色表示であり、比が大きいほど短波長色である。系2蛍光が細胞中心部で相対的に弱い。明条件生育のシアノバクテリア光合成膜は、細胞内では均一であると言われてきた。しかし、我々のこの結果は、明確に光合成膜の性質が細胞内部に向かって変化していることを示す。これは高い空間分解能で3次元蛍光スペクトル画像を得て初めて認知されたといえる。色素濃度が高い光合成系では細胞内吸収、細胞内散乱の効果によるスペクトル変化もあり得るが、3次元で蛍光スペクトルが得られているので細胞内吸収や散乱の効果ではなく、確かに極微領域のスペクトルが変化している事が明確に結論できる。このように細胞内微細領域毎の蛍光スペクトル観察が非常に有用である事が認識される。ただし、上記(図2)のような不均一な細胞内様相が観察されたのは全観察細胞中の約55%で、他45%では細胞内スペクトル変化に系統的な分布が認められなかった。この出現確率の意味については今後の課題である。



The scale bars represent 4 µm

図2 糸状シアノバクテリアの蛍光強度比率マップ

フィコビリゾーム (PBS) と系 2 (PSII) の蛍光比率を 3 次元各点で表示している (系 2 蛍光/ PBS 蛍光)。 虹色表示であり、比が大きいほど短波長色である。細胞中心部において系 2 由来の蛍光相対比率が低い。

## Development of a rapid line-scan and highly sensitive spectromicroscope and its application to the study on thylakoid membrane in chloroplasts and cyanobacteria

Shigeichi Kumazaki and Masahide Terazima Division of Chemistry, Graduate School of Science

Thylakoid membrane is adapted in its morphology and constituion against environmental stress in various cases. Our aim is to understand and control the physiological changes in alive cells by developping optimized microscopic and spectroscopic tools for photosynthetic organisms.

#### 1. Two examples of adaptation of photosynthetic cells against environmental stress

Oxygenic photosynthesis is achieved by two types of pigment-protein complexes called photosystem I and photosystem II. The photoinduced electron-transfer chains of the two photosystems are serially connected. There are also other pigment-protein complexes called light-harvesting (antenna) complexes, the roles of which are primarily to absorb light and transfer the excitation energy to the two photosystems. The ideal situation for the serial electron-transfer systems is that the two photosystems are equally excited, since otherwise there should be extra reducing or oxidizing state or species that are harmful for the sophisticated pigment-protein complexes. The two photosystems possess slightly different spectral features, and the spectral features and numbers of the light-harvesting systems interacting with the two photosystems are different. These conditions necessitate an adjustment of the degree of interaction between those pigment-protein complexes according to intensity and/or spectrum of incident light for photosynthetic cells. Such adaptation is actually achieved through changes in distance relation and number of pigment-protein complexes, and morphology of the thylakoid membrane.

Certain cyanobacteria are also able to reduce atmospheric dinitrogen gas to ammonium ( $N_2$  fixation), by which they survive poor nutritional conditions of air, water, a few inorganic nutrients, and light. However nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis are intrinsically incompatible, because the enzyme responsible for reduction of  $N_2$ , nitrogenase, is impaired by a minute concentration of oxygen. Some multicellular cyanobacteria overcome this incompatibility by differentiating nearly anoxic cells within filamentous chains of cells. Nitrogen fixation takes place in such limited terminally differentiated cells, which are called heterocysts, and the other cells in the same chain carry out normal photosynthesis. Two types of cells exchange photosynthetic products and nitrogen compounds.

#### 2. Optimum observation of photosynthetic cells and their internal structure

Highest priority is to sustain a high degree of noninvasiveness. Far-field mode seems to be more desirable than near-field mode, since the former has 3D resolution. The relatively poor 2D resolution of the far-field mode can be improved by optical nonlinear effects. Two-photon excitation by near-IR pulsed laser seems to be indispensable, because photoexcitation occurs only at the focus and 3D-resolution is improved. Pulsed excitation also enables one to adopt various time-resolved spectroscopy, which tells us inter-complex distances on a nanometer scale in the microscopic volume.

Here is a brief description of the construction and characterization of a laser-scanning semi-confocal microscope capable of a simultaneous detection of true spectra. A resonant scanning mirror oscillating at 7.9 kHz enables a near-infrared femtosecond pulse trains at 800 nm to be illuminated on a line (x axis), and the whole two photon induced fluorescence from the linear region is focused on the slit of an imaging polychrometor. An electron-multiplying CCD camera was used to resolve the fluorescence of different colors at different horizontal pixels and the fluorescence of different spatial positions in the linear region of the specimen at different vertical pixels. The point spread function of the system in full widths at half maxima are  $0.43(\pm 0.06)$  and  $0.19(\pm 0.08)$  and  $0.41(\pm 0.06)\mu$ m for the x, y and z axes, respectively. The resolutions at the latter two axes are comparable to those of typical laser-scanning confocal microscopes to be used in the visible region. Biological application of this microscope was demonstrated in a study on the fluorescence spectra of the thylakoid membrane in a cyanobacterium Anabaena PCC7120 and chloroplasts in plants.

#### 3. Application of the microscope to a cyanobacterium Anabaena PCC7120

The second figure in the corresponding Japanese abstract shows maps of ratio of fluorescence intensities between two wavelength regions of 653 ( $\pm$ 10) and 685 ( $\pm$ 5) nm (F685/F653 ratio maps) at different z sections. The two wavelength regions centered at 653 and 685 nm are selected so as to probe the fluorescence from phycobilisome (PBS) and photosyestem II (PSII), respectively. The F685/F653 ratio maps largely indicate that the ratio value is lower at the core than the periphery of each cell. The relatively low ratio value at the core than the periphery of cells has revealed that physiological status of PBS and/or PSII is somehow different between the core and the periphery. There are two extreme interpretations that are not mutually exclusive. One is that the stoichiometric ratio of PBS is higher at the core than the periphery. The other is that the efficiency of energy transfer from PBS to PSII is somehow lower at the core than at the periphery. A hybrid situation is that there may be more PBS at the core than the periphery and that some extra PBS in the core domain are not closely connected with PSII, which results in higher fluorescence from PBS at the core than the periphery. Fluorescence decay meadurements and/or excitation wavelength dependence in the future will hopefully tell us clearer view on the subcellular physiological status of PSII and PBS.

## キャビティリングダウン分光法を用いた 大気中ラジカル計測装置の開発



工学研究科 分子工学専攻 中山 智喜 支援・助言担当 事業推進担当者 川崎 昌博

対流圏において NO<sub>x</sub>(= NO+NO<sub>2</sub>) は、昼間は NO<sub>2</sub>+OH 反応により生成した HNO<sub>3</sub> が、湿性および乾性沈着することにより大気中から除去されることが知られている。一方、夜間は OH ラジカルが生成しないことから、N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> と H<sub>2</sub>O との不均一反応による HNO<sub>3</sub> 生成過程が、NO<sub>x</sub> の主要な除去過程であると考えられている。Fig. 1 に示したように、大気中で NO<sub>3</sub> ラジカルは、NO<sub>x</sub> がO<sub>3</sub> により酸化されることにより生成する。また、NO<sub>3</sub> は大気中で NO<sub>2</sub> と反応し、N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> を生成する。一方で N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> は熱分解反応により NO<sub>3</sub> を再生する。さらに、NO<sub>3</sub> はいくつかの有機物 (特に不飽和炭化水素や硫黄化合物)とすばやく反応し、それらの化合物の酸化過程に重要な寄与を持つと考えられている。NO<sub>3</sub> は可視領域に強い吸収帯を持ち昼間は光分解によりすばやく消失するため、NO<sub>3</sub> や N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の化学反応過程は、特に夜間に重要となる。

本プロジェクトでは、(1) 大気中 NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> のその場計測装置の開発、(2) N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> と関連化 学種の同時観測、(3) N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の熱分解反応速度定数の測定、の 3 つの課題に取り組んだ。

#### (1) 大気中 NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> のその場計測装置の開発:

従来、大気中 NO<sub>3</sub> の測定には、主に長光路差分吸収法 (DOAS) が用いられてきたが、空間分 解能が数 km と低い問題点があった。また、DOAS では N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の測定はできなかった。近年、キャ ビティリングダウン分光法 (CRDS) やレーザー誘起蛍光法を用い、NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> を高い時間・



Fig. 1 Nighttime chemistry related to  $NO_3$  and  $N_2O_5$  in the troposphere. VOC, volatile organic carbons; DMS, dimethyl sulfide.



Fig. 2 Schematic diagram of our CRDS instrument. MFC, mass flow controller; APD, avalanche photodiode detector; PC, personal computer. 空間分解能でその場で検出できる装置が開発されてきているが、未だ測定例は少ない。本プロジェ クトでは、CRDSを用いた大気中の NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> のリアルタイム計測装置の開発に取り組ん だ。CRDS は高感度な吸収分光法であり、検出光が 2 枚の高反射率ミラー間を、数千から数万回 往復することにより、極めて長い実効光路長が得られる。

Fig. 2 に本研究で開発した装置の概略図を示した。NO<sub>3</sub> 検出のための 662 nm レーザーパルス を 2 枚の高反射率ミラーで構成した光学キャビティ (ミラー間隔:69 cm) へ注入し、もう一方の ミラーから漏れ出した光をフォトダイオード検出器で検出した。漏れ出し光の強度は、指数関数 的に減衰する。キャビティー内に、検出光を吸収する物質が存在すれば、漏れ出し光の減衰の時 定数 (リングダウンタイム) が短くなることを利用し、吸収物質の濃度を測定することができる。本研究ではリングダウンタイム 120  $\mu$ s を達成し、35 km 程度の実効光路長を得ることに成功し た。検出セル内を 353 K に加熱し N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> を熱分解し NO<sub>3</sub> に変換して、NO<sub>3</sub> を検出することにより、NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の総量を測定した。NO<sub>3</sub> が存在しない条件下でのバックグラウンド測定を行う ために、一定時間ごとに NO を添加し、NO<sub>3</sub> + NO → 2NO<sub>2</sub> 反応により NO<sub>3</sub> を取り除いた。NO<sub>3</sub> のみを除去することにより、外気中に含まれる他の気体成分やエアロゾルによる影響を防ぐこと が可能となった。

装置の検出感度の向上のためには、リングダウンタイムのふらつきを抑えることが重要である。 1)低膨張合金製の棒を用いてキャビティを固定する、2)装置をビニル製のハウスで囲むことにより温度変化を抑える、3)ピンホールや光学フィルターを用いて迷光を抑える、4)高分解能の デジタイザ (14 bit)を用いフィッティングの精度を向上させる、等の工夫を重ねることにより、 実大気中の NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> のリアルタイム測定が可能な検出限界 1.5 ppt (NO<sub>3</sub>)および 2.2 pptv (N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (100 秒積算)を得ることに成功した。

#### (2) N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> と関連化学種の同時観測:

(1)で開発した CRDS を用いた NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>の計測装置を実大気におけるリアルタイム計測に応用した。N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> および関連化学種 (NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>)の同時観測を行った。夜間の NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の濃度は、以下の生成・消失反応により決定される。

$$NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2 \tag{1}$$

$$NO_2 + O_3 \rightarrow NO_3 + O_2 \tag{2}$$

$$NO_2 + NO_3 + M \rightarrow N_2O_5 + M$$
(3)  
$$NO_3 + NO \rightarrow 2NO_2$$
(4)

$$NO_3 + NO \rightarrow 21NO_2$$

$$NO_3 + VOCs \rightarrow \text{products} \qquad ($$

$$NO_3 + VOCs \rightarrow products \tag{5}$$

 $N_2O_5 + H_2O(aerosol) \rightarrow 2HNO_3$  (6)

N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>の定常状態濃度は、NO<sub>3</sub>の揮発性有 機化合物 (VOC) との反応における消失過程



Fig. 3 upper panel: Observed, [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>obs</sub> (solid line), and steady state concentrations, [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>ss</sub> (open circles), of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>ss</sub> was calculated using the observed concentrations of NO, NO<sub>2</sub>, and O<sub>3</sub>. lower panel: Difference between [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>obs</sub> and [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>ss</sub>.

(5)、および、N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>のエアロゾル表面における不均一消失過程(6)を無視した場合、NO, NO<sub>2</sub> および O<sub>3</sub> 濃度から見積もることができる。観測された N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 濃度を、定常状態を仮定して NO, NO<sub>2</sub> および O<sub>3</sub> 濃度を用いて見積もった N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 濃度とともに Fig. 3 に示した。21:00PM 以前の両 者の不一致は、日没後、定常状態に到達するまでにある一定の時間が必要であることを示してい る。本研究の結果、観測された定常状態に到達するまでの時間を説明するためには、NO<sub>3</sub> と日没 後に大気への放出がなくなる VOC 成分との反応(5) を考慮する必要があることが判明した。一 方、定常状態に達した 21:00PM 以降における観測と定常状態モデルの不一致は、定常状態モデ ルでは考慮していない N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>のエアロゾル表面における不均一反応 (6) に起因すると考えられる。 観測と定常状態モデルの差から反応 (6) による N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>の消失速度を見積もることに成功し、2 ×  $10^4$  s<sup>-1</sup> (23:30PM 以前) および 1.8 ×  $10^{-3}$  s<sup>-1</sup> (23:30PM 以降) を得た。さらに、得られた N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>の不 均一消失速度と観測した N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 濃度を用いて、観測日の一晩あたりの NO<sub>x</sub> 消失量 0.5 ppbv を得た。 このように、従来計測が困難であった大気中 NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の新たな計測装置を開発すること により、夜間の NO<sub>x</sub> 収支に関する情報を得ることに成功した。

#### (3) N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 熱分解反応速度定数の測定:

夜間の NO<sub>x</sub> 化学を理解する上で重要な反応の 一つである N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 熱分解反応の速度定数の測定を 行った。従来、N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 熱分解反応の計測において は、NO<sub>3</sub> と N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> が平衡状態にある条件下で、NO を添加して NO<sub>3</sub> を取り除き、N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の時間減衰を 化学イオン化質量分析法もしくはフーリエ変換赤 外分光法を用いて観測する方法が用いられてき た。しかし、温度が高くなると平衡が N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> から NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub> 側に偏ることから、N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> を検出するこ れまでの手法では、高温領域での速度定数の測定 は困難であった。そのため、大気圧条件下では、 293 – 323 K および 263 – 304 K での報告がなさ れているのみである。本研究では、CRDS を用い て NO<sub>3</sub> を検出することにより、314 – 348 K の温



Fig. 4 Arrhenius plot for the rate constants of the unimolecular decomposition of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> at 1 atm

度領域における N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 熱分解反応の速度定数を決定した。実験では、NO/O<sub>3</sub> 反応系において生成 した NO<sub>3</sub> を CRDS により高感度に検出した。NO<sub>3</sub> の生成量の温度依存性は、主に N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 熱分解 反応の温度依存性により決定されることから、反応モデル計算を行い、各温度において観測され た NO<sub>3</sub> 濃度を再現する N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 熱分解反応の速度定数を決定した。得られた結果を過去の報告値と 共に Fig. 4 に示した。本研究で得られた結果と過去の報告値を合わせ、大気圧条件下での N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 熱分解速度の温度依存性 7.69 × 10<sup>14</sup> exp(-11130/*T*) s<sup>-1</sup> (263 K  $\leq T \leq$  348 K) を得た。本研究では、 NO<sub>3</sub> を高感度に検出することにより、大気圧条件下での測定がなされていない温度領域 (314 – 348 K) での反応速度計測に成功した。このように、より広い温度範囲で反応速度データを決定す ることにより、反応速度定数の温度依存性のより高精度な見積もりが可能となった。

## Cavity ring-down spectroscopy applied to atmospheric radical measurements

Tomoki Nakayama Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering

(1) Development of *in-situ* detection system of atmospheric NO<sub>3</sub> and N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: An instrument for *in-situ* detection of NO<sub>3</sub> and N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in the ambient air using a technique of pulsed cavity ring-down spectroscopy (CRDS) at 662 nm has been developed. The CRDS detection technique is spreading widely as a high-

sensitive absorption spectroscopy technique, in which high-reflectivity mirrors are used to achieve long effective path length in a short base path, allowing *in-situ* detection of NO<sub>3</sub>. A schematic diagram of our CRDS instrument is shown in Figure 2. The laser light was passed through focusing optics and injected into the ring-down cavity through one of the cavity end mirrors. The cavity mirrors have a maximum reflectivity of 99.996% at 662 nm and were mounted 69 cm apart. The cavity was fixed with three low-expansion alloy rods to minimize thermal alignment drift. Light leaking from one of the cavity end mirrors was detected by an avalanche photodiode detector through an iris and a long-wave pass colorglass filter. Heating the cell to about 353 K induces thermal decomposition of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> to yield NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub>. Thus, the total amount of NO<sub>3</sub> and N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in the air can be detected. The titration reaction of NO with NO<sub>3</sub> was employed for zero determination of the NO<sub>3</sub> concentration. The minimum detection limits of 1.5 and 2.2 pptv in the 100 s interval have been achieved for NO<sub>3</sub> and N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, respectively.

(2) Nighttime measurements of ambient N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and related compounds: *In-situ* measurements of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, and O<sub>3</sub> in sub-urban area have been performed. A newly developed instrument based on pulsed CRDS at 662 nm with thermal converter was used for the observation of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. The N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mixing ratios ranged up to 20 pptv during nighttime. By applying the steady state approximation, the steady state concentrations of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>ss</sub>, were estimated from the observed concentrations of NO, NO<sub>2</sub>, and O<sub>3</sub>. Figure 3 shows the observed N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>obs</sub>, and [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>ss</sub> (upper panel), and the difference between [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>obs</sub> and [N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sub>ss</sub> (lower panel). The observed airmass is considered to be reached to the steady state at around 21:00 PM after sunset. To explain the time scale that the airmass reached to the steady state, the additional loss process of NO<sub>3</sub> by reactions with VOCs that emitted only during daytime is needed. The fact shows that the reaction with VOCs has a potential to be an important sink of NO<sub>3</sub>, especially during several hours after sunset. From the differences after 21:00 PM, the heterogeneous loss rate of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> on the aerosol surfaces was estimated to be 2 × 10<sup>-4</sup> and 1.8 × 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> for the air masses observed before and after 23:30 PM, respectively. Based on the mixing ratios and the heterogeneous loss rate of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, the nocturnal NO<sub>x</sub> loss was evaluated as 0.5 ppbv night<sup>-1</sup>.

(3) Determination of thermal decomposition rate of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: CRDS technique has been applied to measure the thermal decomposition rate of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in 1 atm of air as a function of temperature between 314 and 348 K. In our experiment, the temperature dependence of NO<sub>3</sub> formation in the NO/O<sub>3</sub> reaction system was observed. NO<sub>3</sub> was detected by CRDS at 662 nm. The rate constants of thermal decomposition of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> were determined so that the results of the chemical kinetics simulation consist with the observed concentrations of NO<sub>3</sub>. As shown in Figure 4, the rate constants determined in the present study is in good agreement with the literature values. This work provides the first determination of the rate constants at higher temperature range (>323 K) at 1 atm. The Arrhenius expression of the thermal decomposition rates measured, which is incorporated with literature values down to 263 K, is given by  $7.69 \times 10^{14} \exp(-11130/T) \text{ s}^{-1}$  over the range 263 and 348 K.

#### Presentations

#### ・学会報告

- 1. 中山智喜,井出智幸,竹谷文一,川合恵巳,高橋けんし,松見豊, "N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, NO, NO<sub>2</sub> および O<sub>3</sub> の 同時観測と定常状態モデルへの適用",第12回大気化学討論会,2006.6.14-17,山形.
- 2. 中山智喜,井出智幸,松本淳,高橋けんし,松見豊, "CRDS 分光法による NO<sub>3</sub> および N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 計 測装置の開発と性能評価",第12回大気化学討論会,2006.6.14-17,山形.
- 3. 中山智喜, 松見豊, 川崎昌博, 井上元, "超長光路吸収分光法 (CRDS) の大気計測への応用", 地 球化学会年会第53回大会, 2006.9.13-15, 東京.
- 4. Tomoki Nakayama, "Applications of Cavity Ring-down Spectroscopy to Atmospheric Measurements", Autumn School on Measurement Techniques in Atmospheric Chemistry, 2006.11.7-13, Oberwesel, Germany.

## 高圧力顕微鏡の開発と生体系への応用



理学研究科 化学専攻 西山 雅祥 国際融合創造センター 木村 佳文 支援・助言担当 事業推進担当者 寺嶋 正秀

(1) 高圧力顕微鏡の開発:タンパク質の立体構造は、天然状態では非常に揺らぎやすい性質をも つため、最も安定な構造と数多くの準安定構造との間で平衡状態をとることが明らかにされてい る。この多重構造間の平衡関係は、圧力により可逆的に変化することが知られている。この構造 上の「やわらかさ」は、タンパク質が機能を発現するにあたり、重要な役割を果たしていると考 えられているのだが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究では、高圧下での 蛍光イメージングを可能とする高圧蛍光顕微鏡を新規に開発し、高圧下においてタンパク質の構 造と機能がどのような影響を受けるのか調べた。耐圧性能と高解像度の顕微観測を可能とする小

型の高圧光学容器 (ステンレス製:  $5.2 \times 5.2 \times 3.4 \text{ cm}$ ) を作製した。観測窓の窓材として、直径 3.5 mm、厚さ 1.5 mmのガラス (BK7) を採用したところ、200MPa まで利用できることが確認できた。観測窓の開口角度は 70 度であり、長作動距離の対物レンズ (SLCPlanFl 40x,N. A.=0.55, Olympus) を用いることで、高解像度の蛍光顕微観測を行えるようになった。容器内を観測したところ、蛍光ビーズやローダミンを化学修飾したタンパク質フィラメント (微小管、microtubule)の落射蛍光像を高感度カメラで検出できた。



(2) 高圧力下での微小管の脱重合反応:高圧容器の観測窓には、微小管との結合能のある分子モー ター・キネシンを吸着させておき、それを介して、微小管を固定した。常温常圧力下において、 微小管は安定したフィラメント構造をとっており、脱重合反応は極めて遅いので検出は困難であ

る。それに対して、加圧時には、微小管の+端、-端からそ れぞれ一様に同じ速度で短縮しはじめた。これらの短縮速度 は、圧力の増加と共に指数関数的に増加した。これらの短縮 反応における活性化体積は、+端方向は -90 ± 6 (ml/mol)、-端方向は -84 ± 4 (ml/mol) であった。また、150MPa 以上の圧 力領域では、微小管が途中で切断され、フィラメント構造が 破壊されていく現象が頻繁に観察された。これらの微小管の 短縮反応は、チューブリン分子の結合部位に水分子が侵入す ることで引き起こされていると考えられる。



(3) 高圧力下におけるキネシンー微小管系の in Vitro 運動アッセイ:次に、ATP を加えることで、 高圧力環境下における in Vitro Motility Assay を行った。キネシン=微小管系が発生する滑り速度 は、圧力の増加に伴って減少することが明らかになった。この圧力による滑り運動の阻害効果を 調べるため、滑り速度の ATP 濃度依存性を調べたところ、ATP の結合反応ではなく、加水分解 反応が主に抑制されていることが明らかになった。この実験結果は、常圧下でキネシンの進行方 向とは逆向きに力をかけると、滑り速度が力に対して直線的に減少する現象と極めて類似してい る。タンパク質に対して等方的にかかる圧力が、力と同様のメカニズムでキネシンの滑り運動を 阻害することが判明した。

# Development of a high-pressure microscope and its application to biological systems.

Masayoshi Nishiyama Division of Chemistry, Graduate School of Science Yoshifumi Kimura International Innovation Center

(1) **Development of a high-pressure microscope:** We have developed a novel microscope that enables us to monitor biological objects under high hydrostatic pressure. The high-pressure optical cell was designed to be used with a commercially available microscope and optics for the observation of epi-fluorescent images. By reducing the thickness of the observation window, we can get a large aperture of the optical window (ca. 70°), which enables the microscopic observation with a high resolution. The observation window was made of BK7, because this material is suitable for preparing appropriate surface condition in our experiments.

The high-pressure optical cell was composed of two optical windows, six metal parts, and two O-rings. The metal parts were made of hastelloy C276 and SUS316. The observation and rear windows were attached to their window supports (3 and 4) by adhesion bond, respectively. These were fixed in the cell body by the window support screws and sealed by O-rings, respectively. The high-pressure optical cell was connected to a high-pressure hand pump, via a separator. The hand pump was filled with silicone oil and the oil pressure could be increased up to 500MP. The main body of the separator was a cylindrical tube (SUS316). The inside was separated into two spaces by a thin teflon cap. The one part was filled with silicon oil, and connected to the high-pressure pump. The other part was filled with assay buffer, and connected to the optical cell. The oil pressure was transduced to the buffer solution through the deformation of the Teflon cap. The pressure was measured with a pressure gauge with an accuracy of 1MPa. The high-pressure optical cell can be used up to 200 MPa (~2000 bar) and it was mounted on a commercial inverted microscope to observe epi-fluorescent images of individual microtubules tethered to kinesin molecules on observation window of the high-pressure optical cell.

(2) **Depolymerization of the microtubule:** Microtubule is a cytoskeleton that arranges the shape of the cell and internal components. Microtubule has a long filamentous structure and is composed of tubulin molecules. The dynamics of the polymerization and de-polymerization reactions is strongly dependent on the temperature. The thermodynamic analysis has been performed to study the regulation

mechanism on the microtubule.

We studied the pressure effects on the filamentous structure of the microtubule. The polaritymarked microtubules were attached to kinesin adsorbed on the observation window of the highpressure optical cell. The epi-fluorescent images of the polarity-marked microtubule were monitored at high hydrostatic pressures. As applying the pressure, all of the microtubule started to shorten from the both ends even in the presence of  $10 \mu$ M Paclitaxel. The shortening velocity is constant against a time. The shortening velocity exponentially increased with the pressure and it reached to  $\sim 1 \mu$ m/min at 150 MPa. The shortening reaction took place similarly from the both ends of the microtubule. The pressure dependence of the shortening velocity, *k*, can be expressed by

$$k = k_0 \exp(-P\Delta V^{\ddagger}/k_B T), \tag{1}$$

where,  $k_0$  is the intercept of y-axis and  $\Delta V^{\ddagger}$  is the activation volume of the pressure-induced reaction. The plots were fitted by Eq. 1 with  $k_0 = 1.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  and  $\Delta V^* = -90 \text{ cm}^3/\text{mol.}$  In addition, the breakage of microtubules was also observed at relatively high-pressure levels (>100 MPa).

Salmon reported that the spindle length of Chaetopterus egg is changed by the application of the pressure. When the pressure was reduced to the normal pressure level (0.1MPa), the spindle structure was reconstructed. Therefore, the pressure-induced shortening reaction of the individual microtubules could be caused by the disassembly of tubulin molecules from the ends of microtubule, but not by the denaturation of microtubule. The depolymerization of microtubules could be caused by inserting the water molecules into the binding sites of tubulin molecules. In cells, the length of the microtubule is properly regulated by some microtubule-binding proteins. Kinesin-8 proteins shorten the filamentous structure from the end of the microtubule. On the other hand, katanin molecules sever the filamentous structure. Our results indicate that the microtubule disassembly in cells is caused by modifying the protein hydration.

(3) *in Vitro* **motility Assay for kinesin motors:** Kinesin is an ATP-driven molecular motor that moves processively toward the plus end of a microtubule. The processive movement is explained by a hand-over-hand model in which the two heads of kinesin work in a coordinated manner. According to this model, the rear head detaches from a microtubule, and then attaches to the next binding site. The interaction between the head and tubulin is important for generating the sliding movement. The intermolecular interaction could be changed by applying the pressure. Here, we investigated how the high pressure affects on the motility of kinesin motors.

The polarity-marked microtubule was adsorbed on the kinesin motors attached to the observation window of the high-pressure optical cell. The microtubule-gliding assay was performed in the presence of ATP. Most of the microtubules on the observation window moved smoothly and continuously, even under the high pressure. However, the velocity changes by the application of pressure. When the pressure was reduced to the normal pressure level (0.1MPa), the microtubule-gliding velocity recovered to the normal level. Thus, the high pressure reversibly inhibits the motility of the kinesin motors. The similar inhibitory action has been reported from the experiment by using local anesthetic.

To study the reversible inhibition mechanism, we carried out the motility assay at various pressures and ATP concentrations. The microtubule-gliding velocity decreased with the pressure, and increased with the concentration of ATP. The relationship between the velocity, V, and ATP concentration, [ATP], was fitted to the Michaelis-Menten kinetics equation,

 $V = V_{max} / (1 + K_m^{\ddagger} / [ATP]),$ 

(2)

where  $V_{max}$  is the gliding velocity at saturating concentration of ATP and  $K_m^{\ddagger}$  is the apparent Michaelis constant. As increasing the pressure,  $V_{max}$  and  $K_m^{\ddagger}$  decreased. The ATP binding reaction and following

hydrolysis reactions would be modulated by the application of the pressure. To understand the pressure effects on the kinetic profile, we performed the kinetic analysis with 3-state model, which was originally proposed for the stepwise movements at the normal pressure level. The kinetic pathway is as follows,

 $k_1 \quad k_2 \quad k_3 \tag{3}$  $[K] + ATP \rightarrow [K.T] \rightarrow [K.D] \rightarrow [K] + ADP,$ 

where [K], [K.T] and [K.D] are no nucleotide, ATP and ADP bound state, respectively. We assumed that  $k_1$  and  $k_3$  are dependent on the pressure, but  $k_2$  is independent of the pressure in convenience. The reason is that the pressure-velocity relation at saturating ATP concentration (1mM ATP) is well explained by the pressure-independent and -dependent rate constants. We performed the kinetic analysis of the microtubule-gliding velocity under high pressures. Our results showed that the activation volume of  $k_1$  and  $k_3$  are 7.4 and 48 cm<sup>3</sup>/mol, respectively. The pressure-induced inhibition on the ATP binding reaction was smaller than the following hydrolysis reaction. We consider that functional perturbations are caused by penetration of water molecules into the intermolecular binding sites.

#### **Publications**

- 1. Development of a high-pressure microscope and its application of biological systems, M. Nishiyama, Y. Kimura, Y. Nishiyama, M. Terazima, Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2006 IEEE International Symposium, *in press*.
- 2. Microscopic Analysis of kinesin-microtubule complex under high hydrostatic pressure, M. Nishiyama, Y. Kimura, M. Terazima, *Biophysical Journal in press*.
- 3. How does the high-pressure affect on the bacterial motility? M. Nishiyama, Y. Sowa, S. Kumazaki, Y. Kimura, M. Homma, A. Ishijima, M. Terazima, Fifth East Asian Biophysics Symposium and Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 46, S355 (2006).

#### 新規物質創製変換

## 新規有機合成手法の探索と展開



理学研究科 化学専攻 忍久保 洋・白川 英二・加納 太一 支援・助言担当 事業推進担当者 大須賀 篤弘・林 民生・丸岡 啓二

(1) 遷移金属触媒反応によるコロールの修飾反応の開発:コロールは18元電子系の芳香族化合物 である。多様な金属と錯体を形成し、中心金属の特性に基づく触媒機能をしめす。さらに、可視 領域での強い吸収や発光のため、光学材料や電子材料などの機能材料に向けた研究が行われてい る。このようにコロールは元電子共役系として極めて魅力的である。しかし、さらなるコロール 化学の展開のためにはコロールを選択的に変換していく手法が不可欠であるにもかかわらず、位 置選択的にコロールを変換する手法はこれまで知られていなかった。そこで、金属触媒によりそ の C-H 結合を切断してホウ素を導入することを検討した。宮浦らの芳香族化合物の直接ホウ素 化にならい、イリジウム触媒の存在下、ジホウ素化合物をコロールに作用させると極めて高い位 置選択性でコロールが修飾でき、収率よくホウ素化コロール2が得られることを見いだした。



さらに、本手法で合成したホウ素化コロールを用いた新しい分子の設計・合成に展開した。す なわち、反芳香属性が期待される平面シクロオクタテトラエン骨格をもつ二重縮環コロール二量 体をデザインし、実際に合成を達成した。さらに、この分子の物性について研究を進めたところ、 ESR・SQUID 測定および理論計算から3は閉核分子ではなく、空気中室温でも安定なビラジカ ル分子であることが明らかになった。







(2) パラジウム触媒による Si – Si 結合の活性化を利用した新規反応:遷移金属触媒を用いるジ シランの反応としては、これまで不飽和結合のビスシリル化やハロゲン化アリールのシリル化 などが知られていたが、最も入手容易なジシランであるヘキサメチルジシラン (Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub>) は、 その反応性の低さ故に利用例が少なかった。我々は、入手容易な [PdCl(η<sup>3</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)]<sub>2</sub> を ROH (アル コールや水)存在下 Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub> と反応させることで生じる PdH(Cl)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> が、Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub> のケ イ素 – ケイ素結合を切断し Me<sub>3</sub>SiH および Me<sub>3</sub>SiOR に変換するための有効な触媒となることを 明らかにし、この知見を基に、これまでとは異なる Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub> の利用法を開発した。

上記の反応において ROH の代わりに重水を用いると PdD(Cl)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> と Me<sub>3</sub>SiD が得られるこ とになるが、これらをそれぞれ触媒および還元剤として利用することで、アルキンの 1,2-ジ重水 素化アルケンへの還元が進行することを明らかにした。反応機構の解明などに有用な重水素化ア ルケンが、最も安価な重水素源である重水を用いて得られるという点で優れた方法である。



さらに、パラジウム触媒による Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub>の活性化を利用して、中性に近い条件でアルコール をトリメチルシリル化する方法を開発した。塩基などの添加物を加える必要がなく、Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub> をアルコールに対して 0.6 当量しか必要としないアトムエコノミーに優れた反応である。



(3) ジアミン型有機分子触媒を用いたエキソ選択的不斉 Diels-Alder 反応の開発: Diels-Alder 反応の開発: Diels-Alder 反応は二つの新たな炭素-炭素結合と、最大で四つの不斉中心が形成されることから、有機合成に

おいて最も有用で一般的な手法のひとつとなっている。これまでに、キラル補助剤や不斉ルイ ス酸触媒を用いた不斉 Diels-Alder 反応が数多く報告されているが、ジアステレオ選択性に関し ては、基質特異的な例を除いてはエキソ選択的な Diels-Alder 反応はほとんど報告されていない。 また 2000 年に先駆的な研究として、MacMillan らによって有機触媒を用いた不斉 Diels-Alder 反 応が報告されているが、良好なエナンチオ選択性とは対照的にジアステレオ選択性はほぼ 1:1 と まだまだ改善の余地を有していた。本プロジェクトでは、触媒としてビナフチルジアミン誘導体 1 のプロトン酸塩を用いることにより、α位に置換基を持たないα,β-不飽和アルデヒドとシクロ ペンタジエンの Diels-Alder 反応が高エキソ選択的に進行することを見出した。



また、本触媒システムを不斉反応へと適用し、触媒骨格及び反応条件の最適化を行ったところ、 高エキソ選択的かつ高エナンチオ選択的に反応が進行することも見出した。



## Novel methodology in organic synthesis and development

Hiroshi Shinokubo, Eiji Shirakawa, and Taichi Kano Department of Chemistry, Graduate School of Science

(1) Regioselective Modification of Corroles by Means of Transition Metal Catalysis: Transition metal catalyzed transformation of corroles has been developed. Corroles are quite attractive  $18 \pi$  aromatic pigments, but suffer from lack of effective modification reactions. Iridium catalyzed direct borylation of triarylcorroles provides mono-borylated corroles in excellent yields with perfect regioselectivity. On the basis of this method, novel doubly fused corrole dimers, which contain planar cyclooctatetraene, have been synthesized efficiently through palladium catalyzed oxidative homocoupling of borylcorrole followed by the oxidative fusion reaction of a singly linked corrole dimer. ESR and SQUID measurement as well as theoretical calculation elucidated that the oxidized form of doubly fused corrole dimers exists as an exceptionally stable biradical in air at room temperature, not as a normal closed shell molecule.

(2) New Reactions Utilizing Activation of Si–Si Bonds by a Palladium Catalyst: Disilanes are known to be good substrates for transition metal-catalyzed reactions. However, hexamethyldisilane (Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub>), one of the most easily available disilanes, has been a rather poor substrate because of its low reactivity. We found that PdH(Cl)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, generated from easily available [PdCl( $\eta^3$ -C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)]<sub>2</sub> on treatment with Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub> in the presence of ROH (alcohol, water,···), readily catalyzes the cleavage of the Si–Si bond of the disilane to give Me<sub>3</sub>SiH and Me<sub>3</sub>SiOH. Here we report new reactions utilizing this new method of activation of Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub>. Use of deuterium oxide is used instead of ROH in this reaction gives PdD(Cl)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and Me<sub>3</sub>SiD. We disclosed that, utilizing the thus generated deuterium-containing catalyst and reagent, dideuteration of alkynes can be accomplished with deuterium oxide, the most inexpensive deuterium source. In addition, we developed a new trimethylsilylation method of alcohols using only 0.6 equiv of Me<sub>3</sub>SiSiMe<sub>3</sub>. This highly atom-economical reaction proceeds under essentially neutral conditions without adding any additive but [PdCl( $\eta^3$ -C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)]<sub>2</sub>—PPh<sub>3</sub> as a catalyst.

(3) *exo*-Selective Asymmetric Diels-Alder Reaction Catalyzed by Diamine Salts as Organocatalysts: A novel binaphthyl-based diamine (*R*)-2 was designed and synthesized. A protonic acid-(*R*)-2 salt catalyst has the advantage of exhibiting unprecedented high *exo* selectivity in the asymmetric Diels-Alder reaction of  $\alpha$ ,  $\beta$  -unsaturated aldehydes. For instance, the reaction between cinnamaldehyde and cyclopentadiene in the presence of 12 mol% of binaphthyl-based diamine (*R*)-2 and 10 mol% of *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O in  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trifluorotoluene at -20 °C gave the corresponding *exo* cycloadduct with 92% ee as a major diastereomer (*exo/endo* = 12.8/1).

#### **Publications**

- 1. "Synthesis and Biradicaloid Character of Doubly Linked Corrole Dimers", S. Hiroto, K. Furukawa, H. Shinokubo, A. Osuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12380-12381 (2006).
- 2. "Palladium-Catalyzed Silylation of Alcohols with Hexamethyldisilane", E. Shirakawa, K. Hironaka, H. Otsuka, T. Hayashi, *Chem. Commun.*, 3927–3929 (2006).
- 3. "*exo*-Selective Asymmetric Diels-Alder Reaction Catalyzed by Diamine Salts as Organocatalysts", T. Kano, Y. Tanaka, K. Maruoka, *Org. Lett.* **8**, 2687-2689 (2006).

## クロマチン高次構造制御タンパク質の構造機能相関



工学研究科 分子工学専攻 有吉 眞理子 支援・助言担当 事業推進担当者 白川 昌宏

細胞および分化特異的な遺伝子発現を制御するゲ ノム上の機能ドメインは、転写活性が正と負にある 領域の境界に位置する DNA 配列要素であるインシュ レーターによって規定される。ヒトゲノムには多数 のインシュレーター配列が存在し、CTCF (CCCTCbinding factor) 蛋白質は、11 個の Zn フィンガーを いろいろな組み合わせで使うことによって、多様な インシュレーター塩基配列を認識する 'multi-DNA binding protein' である。形成された CTCF: DNA 複 合体上に様々な蛋白質因子が作用して、インシュレー ター複合体を形成、さらにクロマチン構造変換や転 写の分子機械がリクルートされる。このような複雑 な蛋白質複合体形成は、CTCF が結合するそれぞれ の DNA 塩基配列に特異的であり、CTCF が関与する 多様な機能を担っている。本研究プロジェクトでは、 磁気共鳴計測技術とX線結晶構造解析を併用して、 CTCF の特徴である DNA 結合の多様性を理解するた め、CTCF の立体構造と配列特異性について系統的 に解析することを計画した。

CTCF の構造機能相関解明に向け、ヒト由来 CTCF の DNA 結合ドメイン (Zn フィンガードメイン, 32kDa) とその両端にあるN末端 (27 kDa) およびC末端領域 (22 kDa)、それぞれ 3 つのフラグメントについて、大腸 菌を用いた大量発現系を確立し、安定な構造ドメイ ンの同定を行った。CTCF の DNA 結合ドメインに 関して、インシュレーターとしてよく研究されてい る *Igf2/H19* インプリンティングコントロール領域の CTCF 結合配列を用いて、ゲルシフトアッセイによ りその DNA 結合活性を確認した。また、電子スピン 共鳴法を用いて、この DNA 結合による構造変化を解



## Chromatin domain structure regulated by insulators

Chromatin is divided into two regions in which gene expression is active (yellow) and repressive (blue), respectively.



Spin labelling of CTCF

析することを計画した。スピンラベルを導入するために2種類のシステイン変異体を作成し、ス ピンラベル化の条件検討を行っている。核マトリックスタンパク質との会合に関与している可能 性が示唆されているN末領域、CTCF-N27の結晶化を行い、微結晶を得た。X線回折実験に適した結晶を得るために結晶化条件および精製条件等の改良が必要である。また、アミノ酸配列に基づいた2次構造予測および限定分解などの生化学的な実験結果から、このN末端領域になんらかのコア構造(19 kDa)が存在する可能性が示唆された。このコアドメイン、CTCF-N19を組換えタンパク質として発現、精製し、NMR 測定のためのラベル化タンパク質を調製した。今後、NMR およびX線回折法による立体構造および核マトリックスタンパク質との結合実験を進める。

### Structural and functional study on a chromatin insulator protein

Mariko Ariyoshi Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering

Insulators are regulatory elements that establish independent chromatin domains of transcriptional activity within eukaryotic genomes. The insulator action is essential for activation and silencing of genes according to its own distinct program in each cell. Recent studies highlight a link of the insulator action to genomic imprinting, X-activation and human disease. The protein CTCF plays a crucial role in the insulator action in vertebrates. CTCF interacts with several insulators including a methylation-sensitive element in imprinting control regions. Genetic and biochemical studies to date suggest that CTCF employs its multivalent interaction ability to various DNA and protein elements for regulation of the chromatin boundaries. I plan to pursue biochemical and structural studies on human CTCF using a combination of X-ray crystallography and spectroscopic techniques such as NMR and ESR. New structural and biochemical insight of the CTCF protein will increase our understanding of development and epigenetics both in normal and cancer cells, which may be eventually applied to gene therapy.

Biochemical and structural analysis require a relatively large amount of homogeneous protein material. First I established the efficient protein expression and purification systems for preparation of the recombinant CTCF functional domains; a DNA binding domain (MW 32 kDa) composed of 11 Zn finger motifs, the N-terminal region (CTCF-N27, MW 27 kDa) responsible for the interaction with nuclear matrix proteins, and the C-terminal region (CTCF-C22, 22 kDa). The proteins with GST affinity tag were expressed in *E.coli* cells. In order to introduce spin labels for ESR measurement, the cysteine mutants were produced. The DNA binding ability of each recombinant DNA binding domain was confirmed by an electrophoresis mobility shift assay. The CTCF-N27 was subjected to crystallization and small crystals were obtained although crystallization conditions need to be refined for further structural analysis. In addition, computational and biochemical analysis on CTCF-N27 allowed us to identify a novel core domain. The interaction of this core domain with a nuclear matrix protein will be investigated using biochemical techniques and NMR.

## 多核多次元 NMR を使った細胞内タンパク質の in vivo 観察



工学研究科 分子工学専攻 杤尾 豪人 支援・助言担当 事業推進担当者 白川 昌宏

NMR 法は原子レベルの分子構造情報を取得できるのみならず、生体に対する低侵襲性が一つの大きな特徴である。我々は、NMR を生きた細胞に適用し、細胞内において実際に機能しているタンパク質の構造・機能情報を取得する In-Cell NMR 法の開発を行なっている。

#### アフリカツメガエル卵母細胞を使った In-Cell NMR

大腸菌のような原核生物に関しては数件の In-Cell NMR の実施例が報告されているものの、細胞内構造がより複雑で生物学的により興味深い真核生物由来の細胞を用いた研究例はない。本研究では、発生生物学や生理学研究のモデル生物として汎用されるアフリカツメガエルの卵母細胞を用いて In-Cell NMR 実験を行なった。

細胞内には様々なタンパク質のほか、糖、脂質、核酸、その他の低分子化合物など、多種多様 な分子種が混在している。従って、そのような混合物中から観測したいタンパク質の NMR シグ ナルのみを選択的に取り出す必要がある。これを実現するために、まず観測対象タンパク質の全 窒素を<sup>15</sup>N (天然存在比 0.4%)で標識した試料を調製する。この試料を卵母細胞にマイクロイン ジェクションし、細胞が生きた状態を保ったまま NMR 試料管に入れて測定を行なう (図 1)。二 次元<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 法によって、細胞のような混合系であっても、<sup>15</sup>N 標識タンパク質の NMR シ グナルが選択的に観察でき、構造情報を得られると期待される。



図 1 a. アフリカツメガエル b. 摘出した卵巣 c. 単離した卵母細胞 d. マイクロインジェクション e. NMR 測定管に詰めた卵母細胞

まず、<sup>15</sup>N で標識したユビキチン (76 アミノ酸残基からなるタンパク質) をテスト試料として 調製し、これを卵母細胞に注入し上記スペクトルを測定した。ところが予想に反して、図 2a に 示すように、NMR シグナルは極めて弱く、スペクトルを殆ど観測できなかった。細胞内のユビ キチンの濃度は数十µM に調節してあり、十分観測可能な量であることから、測定感度の問題で はないと考え、種々のアミノ酸置換ユビキチンを用いて検討を行なった。その結果、あるユビ キチン誘導体 (L8A, I44A, V70A-D77 Ub) が、卵母細胞内において比較的良好な 2D HSQC スペ クトルを与えることがわかった (図 2b)。このユビキチン誘導体は、三つのアミノ酸残基 (Leu8, Ile44, Val70) がアラニンに置換されている。これら三つのアミノ酸残基は、ユビキチンの機能に 極めて重要であり、アラニンに置換されることによって、ユビキチンのリガンドへの親和性が著 しく弱められることが分かっている。一般に、溶液 NMR では分子量増大は横緩和時間 (T<sub>2</sub>) の短 縮につながり、NMR シグナル強度の減弱が起こる。このことと、細胞内には多種多様なリガン ド (ユビキチン結合タンパク質) が存在することを考え合わせると、以上の観察結果は以下のよう に解釈できる。つまり、マイクロインジェクションした野生型ユビキチンは卵母細胞内でリガン ドタンパク質と結合して高分子量タンパク質複合体となり、スペクトル強度が弱くなる (図 2a) が、誘導体 (L8A, I44A, V70A-D77 Ub) では細胞内リガンドとの結合親和性が弱いため複合体形 成が起こらず、細胞内でも単量体として振るまい、そのため NMR シグナル強度の減弱は起きな い (図 2b)。

以上のように、<sup>15</sup>N 標識タンパク質のマイクロインジェクションと二次元<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペク トルによって生きた細胞内のタンパク質の NMR シグナルを検出することに成功した。但し、細 胞内で高分子量複合体を形成する場合は、シグナル強度が弱くなるという問題点もはっきりした。 この問題は、タンパク質試料の重水素化、TROSY 法、CRIPT/CRINEPT 法の適用によって、あ る程度の改善は見込めると考えている。



図 2

- a) 野生型ユビキチン
- b) L8A, I44A, V70A-D77 Ub の細胞内スペクトル
- c) L8A,I44A,V70A-D77 Ub の 水溶液中でのスペクトル

#### in vitro (水溶液中)と in vivo (細胞内) での NMR スペクトルの比較

上記ユビキチン誘導体 (L8A, I44A, V70A-D77 Ub)の水溶液中 (図 2c) と卵母細胞内での二次元 スペクトル (図 2b)を比べると、交差ピークの位置が、ほぼ同じであることから細胞内でもユビ キチンの三次元構造は水溶液中とほぼ同一であり、大きなコンフォメーション変化は起こってい ないことがわかった。ユビキチンは極めて強固な立体構造を持っているので、これは予想どおり であった。しかしながら、G76 交差ピークの移動及び D77 交差ピークの消失が見られた。この ことは、卵母細胞内で G76 と D77 間のペプチド結合が切断されたことを意味する。この切断は、 細胞を脱ユビキチン化酵素の特異的阻害剤で前処理することによって抑制された。このことから、 切断は細胞内の脱ユビキチン化酵素により引き起こされていることがわかった。さらに、経時的 に 2D HSQC スペクトルを測定することにより、細胞内で起こっているこのペプチド結合の切断 を追跡することに成功した (図 3)。In-Cell NMR を使って真核細胞内のタンパク質の生化学反応 を追跡した例はこれまでになく、重要な成果である。



図3 卵母細胞内のユビキチン誘導体 (L8A, I44A, V70A-D77Ub)のAsp77 のアミドHN 交差ピークの細胞内で の経時変化。 現在、細胞の生命活動とカップルしたタンパク質コンフォメーション変化や、タンパク質-リガンド相互作用の In-Cell NMR 検出を目指して研究を行なっている。

## In-cell NMR spectroscopy of proteins inside Xenopus laevis oocytes

Hidehito Tochio Division of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering

In-cell NMR is an application of solution NMR that enables the investigation of protein conformations inside living cells. We have measured in-cell NMR spectra in oocytes from the African clawed frog *Xenopus laevis*. <sup>15</sup>N-labeled ubiquitin and its derivatives were injected into *Xenopus* oocytes and two-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N correlation spectra of the proteins were obtained. While the spectrum of wild-type ubiquitin in oocytes had rather fewer cross-peaks compared to its *in vitro* spectrum, ubiquitin derivatives that are presumably unable to bind to ubiquitin-interacting proteins gave a markedly larger number of cross-peaks. This observation suggests that protein-protein interactions between ubiquitin and ubiquitin-interacting proteins may cause NMR signal broadening, and hence spoil the quality of the in-cell HSQC spectra. In addition, we observed the maturation of ubiquitin precursor derivative in living oocytes using the in-cell NMR technique. This process was partly inhibited by pre-addition of ubiquitin aldehyde, a specific inhibitor for de-ubiquitinating enzyme (DUB). Our work demonstrates the potential usefulness of in-cell NMR with *Xenopus* oocytes for the investigation of protein conformations and functions under intracellular environmental conditions.

#### **Publications**

1. In-cell NMR spectroscopy of proteins inside *Xenopus laevis* oocytes, T. Sakai, H. Tochio, T. Tenno, Y. Ito, T. Kokubo, H. Hiroaki, M. Shirakawa, *J Biomol NMR*, **36**, 179-88 (2006).