

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12608
 研究種目：特定領域研究
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19056002
 研究課題名（和文）
 分子クラスターから細胞に至る分子認識系の光励起ダイナミクスと素過程解明
 研究課題名（英文）
 Elementary process of molecular recognition from cluster to cell
 研究代表者
 藤井 正明 (Fujii Masaaki)
 東京工業大学・ソリューション研究機構・教授
 研究者番号：60181319

研究成果の概要（和文）：

レーザー蒸発法の改良を進め、金ナノ粒子やカーボンブラックが生体試料の有効な脱離補助物質である事を見出した。これを用いて神経伝達関連物質の紫外及び赤外スペクトルを系統的に測定し、その構造を決定した。アセトアニリド-水クラスターの光イオン化による水分子の再配向ダイナミクスをピコ秒時間分解赤外分光により、初めて分子論的に捉えることに成功した。振動和周波分光法と顕微鏡を融合させ、回折限界を 14 倍超える赤外超解像顕微鏡の開発に成功し、細胞への適用を行なった。

研究成果の概要（英文）：

Various materials to increase the efficiency of laser desorption of nonvolatile biomolecules were explored. Gold nano particle and carbon black were concluded as the best materials. The development enables us to determine structures of catecholamines and related molecules systematically by their UV and IR spectra. Picosecond time-resolved IR spectroscopy was applied to ionization triggered water migration dynamics in acetanilide-water system. This revealed details of the dynamics of single water molecule from the molecular point of view for the first time. Vibrational sum-frequency generation and optical microscope were combined to develop an IR super-resolution microscopy. 14 times higher spatial resolution than the IR diffraction limit was achieved and internal structures of cells were successfully visualized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	27,800,000	0	27,800,000
2008 年度	27,500,000	0	27,500,000
2009 年度	17,030,000	0	17,030,000
2010 年度	8,500,000	0	8,500,000
2011 年度	6,800,000	0	6,800,000
総計	87,630,000	0	87,630,000

研究分野：分子分光学

科研費の分科・細目：基礎科学・物理化学

キーワード：生体関連分子、レーザー分光、レーザー蒸発法、超音速ジェット、赤外分光、時間分解分光、質量分析

1. 研究開始当初の背景

気相中では溶媒分子などの外乱がなく分子間衝突のない理想的な環境で精密な分光研究が可能である。しかし、難揮発性の生体関連分子を気相中で研究するためには、熱に弱い試料を如何に気化するかが問題であった。このような研究は欧米の研究者の間ですでに多くの試みがなされていたが、日本では本研究開始時点では十分に利用可能とは言いがたい状況であった。さらに気相で得られた個別の分子の性質が凝集相における分子の振る舞いとどのように関連するかについて系統的な研究は、系の乖離の大きさからその間をつなぐ試みはほとんどなされていなかった。

また、高次分子システムを制御する化学反応およびメカニズムを詳細に理解するためには、気相における精緻な分光によるダイナミクスの観測は欠かせないものである。しかしこれまで気相の分光においては、分子の静的な構造や相互作用を対象に研究が行なわれていたが、個々の分子を捉えて構造をととの関連を明確に規定した上でそのダイナミクスを観測することは確立していなかった。

2. 研究の目的

本研究は気相における精密分光法を適用することにより高次分子システムの駆動機構を分子論的に解明するという戦略に基づき、分子認識系から抜き出した分子認識系を主たるモデル系として気相さらには液相中において、選択的水素結合錯合体形成・解離過程における構造変化や、さらには光励起に伴う、化学反応、構造変化、緩和過程を明らかにすることを目的とした。

気相中では溶媒分子などの外乱からの摂動のない理想的な環境で反応中心に対する精密な分光研究が可能である。しかし、生体関連分子を気相中で研究するためには、熱に弱い試料を如何に気化するかが問題である。そこで、本研究では生体関連分子に適用できる新たな非破壊的気化法であるグラフィートマトリックス法を中心に、非加熱的な試料気化を開発し、生体関連分子の気相分光の実現を目的とした。また、液相中での過渡蛍光検出赤外分光などによる測定も同時に行ない、気相中で測定した結果が溶媒分子の存在する実環境下に適用できるのかの検証も目的とした。最終的に、気相を中心に溶液中の生体関連分子、さらには細胞に至るまで幅広く測定を行うことで、新分野創出の足掛かり

とすることを目標とした。

3. 研究の方法

1) 生体関連分子の種々の気化法の開発
生体関連分子は蒸気圧が低く、熱分解性のものが多いため、単純加熱により気化し超音速ジェットを得る事は通常困難である。アミノ酸や低分子量の神経伝達物質等には一部単純加熱法でも気化できる物も知られているが、ポリペプチドやさらに大きな分子量の物質では単純加熱法は最早不可能である。これらの分子に対応するために、レーザー蒸発法、液体噴霧法の開発を行なった。レーザー蒸発法は、固体試料にレーザー光を集光し、瞬間的に蒸発させる方法である。純目的試料でも適用可能であるが、グラフィート等のマトリックス剤の混合による気化効率の向上とレーザー照射に伴う分解の抑制がMALDI法として広く行われている。しかし、MALDI法と異なり本研究では中性種の幾何学を目的としているため、マトリックス剤やレーザー集光機構、試料移動機構の工夫により、長時間に亘り安定な試料気化法を確立する必要があった。

2) 分子認識錯合体の超音速ジェット中レーザー分光

種々のレーザー分光法を適用し、分子認識錯合体の構造や光励起に伴う化学反応、構造変化のダイナミクスを明らかにする。実験の解析には理論化学計算を併用する。

難揮発性生体分子のジェット分光と構造解析

神経伝達過程に関与する神経伝達物質やその受容体のモデルとなる数塩基からなるペプチド鎖を真空中にジェット噴射し、IR-UV二重共鳴分光法及び量子化学計算を適用し、構造を明らかにする。解析には理論化学計算を併用した。このような巨大な分子の量子化学計算はその効率的な適用法がまだ確立していないため、そのような方法の探索も並行して行なった。

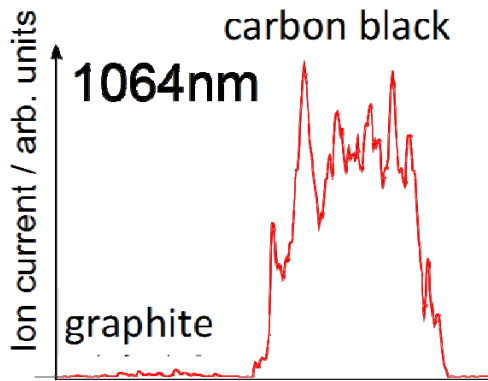
気相における溶媒ダイナミクスの観測と凝集相への展開

ピコ秒時間分解分光法を用いて、光励起に伴う化学反応、構造変化、緩和過程を追跡し、そのダイナミクスの解明を試みた。また、気相中で測定した結果が溶媒分子の存在する実環境下に適用できるのかを検証するために、溶液中での測定も同時に行なった。さらに、顕微鏡法の利用を図り、研究対象を細胞まで広げること同時に行なった。得られた

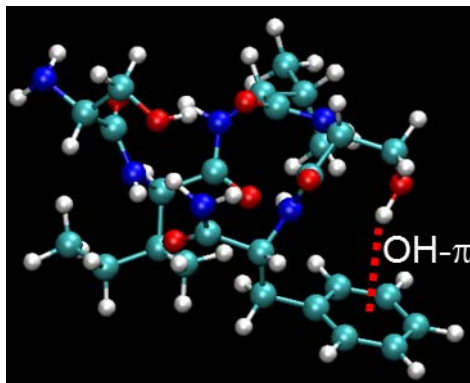
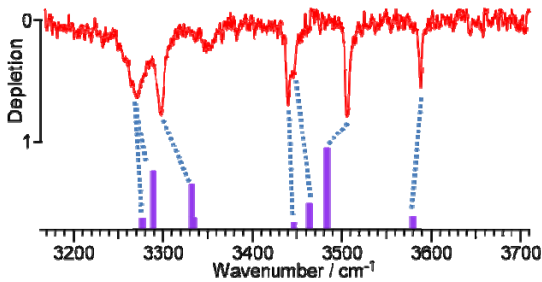
データは気相の結果と比較・検討を行い、分子認識メカニズムの包括的理解を試みた。

4. 研究成果

レーザー蒸発法を中心に非破壊蒸発を促進する手法を探索し、532 nm の蒸発光には 15 nm の金ナノ粒子（北大米澤らとの共同研究）、1064 nm にはカーボンブラックが高效率かつ非破壊で生体分子を脱離させる補助物質である事を発見した（下図）。

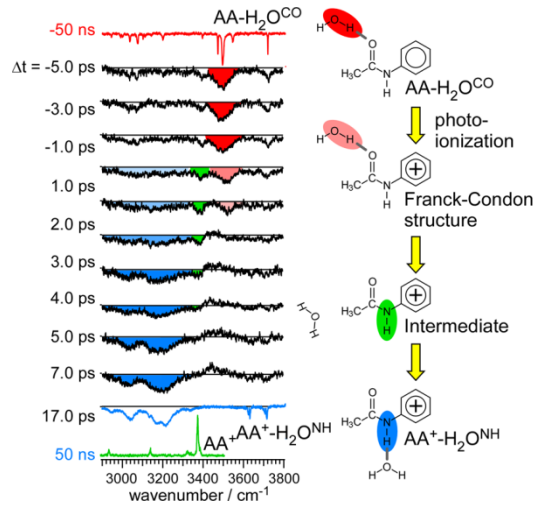


これを用いてアドレナリン受容体のポケット部分のモデルペプチドの紫外及び赤外スペクトルを系統的に測定してその構造を決定した。フレキシブル構造が可能なはずの分子であるにも関わらずコンフォーメーション数が一つしか観測されない事を明らかにし、その理由を分子内相互作用と障壁の観点から論じた。（下図）。

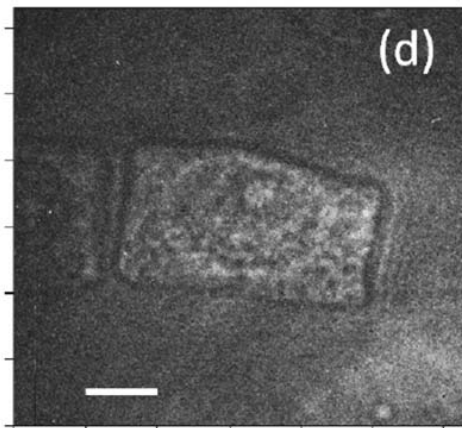


ペプチド結合を有する最小モデル系アセトアニリド ($\text{H}_3\text{C}-\text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_5$) 水クラスター

でイオン化により水分子がCO基からNH基へ再配向するダイナミクスのピコ秒時間分解赤外分光測定に成功し、溶媒ダイナミクスの分子論的理解に道を開いた。水分子が移動する速度を見積もり、移動経路にあたる中間体の存在を初めて明らかにした（下図）。



界面に敏感な振動和周波分光法と顕微鏡を融合させ、回折限界を14倍を超える赤外超解像顕微鏡の開発に成功した。下図に示したタマネギの根毛細胞や肺癌細胞 A549 などの試料を特定の赤外吸収バンドでイメージングする事に成功し、また分子の配向まで決定できる事を示した。これまで振動情報に基づいた研究は主にラマン分光を利用していたが、相補的な情報が得られる赤外分光により細胞内の微細構造の研究が可能になる意義は大きいと言える。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 81 件)

(査読有) [Masaaki Fujii](#) and Otto

Dopfer

“Ionisation-induced site switching dynamics in solvated aromatic clusters: phenol-(rare gas)_n clusters as

prototypical example”
Int. Rev. Phys. Chem. **31**, 131-173 (2012).

(査読有) Shun-ichi Ishiuchi, Haruhiko Mitsuda, Toshiro Asakawa, Mitsuhiko Miyazaki, Masaaki Fujii
“Conformational reduction of DOPA in the gas phase studied by laser desorption supersonic jet laser spectroscopy”
Phys. Chem. Chem. Phys. **13**, 7812-7820 (2011).

(査読有) Keiichi Inoue, Masaaki Fujii, Makoto Sakai
“Development of a Non-scanning Vibrational Sum-Frequency Generation Detected Infrared Super-Resolution Microscope and Its Application to Biological Cells”
Appl. Spectrosc. **64**, 275-281 (2010).

(査読有) Yusuke Komori, Hisashi Shima, Tatsuya Fujino, Junko N. Kondo, Kenro. Hashimoto, Takashi Korenaga
“Pronounced Selectivity in Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry with 2, 4, 6-Trihydroxyacetophenone on a Zeolite Surface: Intensity Enhancement of Protonated Peptides and Suppression of Matrix-Related Ions”
J. Phys. Chem. C **114**, 1593-1600 (2010).

(査読有) Daisuke Suzuki, Yuji Furutani, Keiichi Inoue, Takashi Kikukawa, Makoto Sakai, Masaaki Fujii, Hideki Kandori, Michio Homma, Yuki Sudo
“Effects of Chloride Ion Binding on the Photochemical Properties of Salinibacter Sensory Rhodopsin I”
J. Mol. Biol. **392**, 48-62 (2009).

[学会発表] (計 125 件)

Masaaki Fujii
“Water migration dynamics in ionic clusters”
Gordon Research Conferences: Molecular and Ionic Clusters 2012
(Ventura, CA, USA, Feb. 2, 2012)

Makoto Sakai
“Development of a super-resolving IR micro-spectroscope and its application to biological cells”

Isolated Biomolecules and Biomolecular Interactions 2012
(Les Diablerets, Switzerland, Jan. 24, 2012)

Shun-ichi Ishiuchi
“Gas-phase spectroscopy of biomolecules by gold nano particle assisted laser desorption supersonic jet technique”
The 2010 Molecular and Ionic Clusters Conference
(Toukamachi, Niigata, Japan, Sep. 8, 2010)

Mitsuhiko Miyazaki, Shun-ichi Ishiuchi, Makoto Sakai, Masaaki Fujii
“Real time observation of excited state hydrogen transfer reaction in phenol-(NH₃)_n (n=4, 5) clusters by ps time resolved infrared spectroscopy”
238th National ACS Meeting, Division of Physical Chemistry
(Washington D. C., USA, August 17, 2009)

Masaaki Fujii
“Real-time observation of ionization induced site switching in phenol-rare gas clusters by picosecond time-resolved IR dip spectroscopy”
The 236th ACS National Meeting (PHYS 49)
(Philadelphia, Pennsylvania, USA, August 17-21, 2008)

[図書] (計 3 件)
Makoto Sakai, Keiichi Inoue, Masaaki Fujii (章著)
“Super-resolution Infrared Microspectroscopy for Single Cells”
Hiroshi Fukumura, Masahiro Irie, Yasuhiro Iwasawa, Hiroshi Masuhara, Kohei Uosaki eds., Molecular Nano Dynamics, Vol. 2, Chap. 29, pp. 571-588.
Wiley-VCH (2009)

[その他]
ホームページ等
<http://www.res.titech.ac.jp/~kiso/koujikei.html>

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
藤井 正明 (FUJII MASAOKI)
東京工業大学・ソリューション研究機構・教授
研究者番号 : 60181319

(2)研究分担者

酒井 誠 (SAKAI MAKOTO)
東京工業大学・資源化学研究所・准教授
研究者番号：60298172

石内 俊一 (ISHIUCHI SHUN-ICHI)
東京工業大学・資源化学研究所・助教
研究者番号：40338257

橋本 健朗 (HASHIMOTO KENRO)
首都大学東京・理工学研究科・准教授
研究者番号：40202254

(3)連携研究者

三澤 健太郎 (MISAWA KENTARO)
東京工業大学・資源化学研究所・特任助教
研究者番号：10431991

宮崎 充彦 (MIYAZAKI MITSUHIKO)
東京工業大学・資源化学研究所・助教
研究者番号：00378598