

令和元年6月20日現在

機関番号：32702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13926

研究課題名(和文) 光で誘起する電子と核のスピン分極発生現象と革新的なタンパク質水和圏計測法

研究課題名(英文) Novel method to observe solvation structure of protein utilizing photo-induced electron spin and nuclear polarization

研究代表者

河合 明雄 (Kawai, Akio)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：50262259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、タンパク質など重要分子を取り囲む溶媒分子を選択観測する磁気共鳴法開発を将来目標とし、考案中の計測原理の有効性を担保する光誘起電子スピン分極(DEP)発生や核スピン分極(DNP)発生の解明を目的とした。キサントン色素のレーザー照射による三重項励起状態生成とそのニトロキシドによる緩和過程を、時間分解ESR法で観測し、ニトロキシドに発生するDEP強度の定量実験を行った。DEPは、溶媒サイズに著しく依存し、その原因をラジカル三重項対機構で説明した。DEPが強かつ溶媒と関連する化学系が見出されたので、この系でのOverhauser効果によるDNP発生の考察や今後の研究展開指針を定めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質などの機能にあふれた巨大分子では、その溶媒和構造が機能発現と密接に関連する。溶媒和圏のみを選択観測し、溶媒和圏の変化を正確に知ることが、機能発現の仕組みを理解する近道である。そのため、溶媒和圏の観測感度が大きくなる実験手法の開拓が必要である。本研究が解明したキサントン系色素とニトロキシドの系での光照射による電子スピン分極発生は、これらの分子の近傍にある溶媒の核スピン分極を発生させ、これらの溶媒のみNMR観測する可能性を明確に示した。溶媒和圏選択的な観測法の実現が近づき、同様の興味をもつ国内外の研究者との共同研究発展にもつながっている。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel method to observe solvation structure of important molecules such as proteins, we investigated photo-induced dynamic electron polarization (DEP) and nuclear polarization. We found large and solvent dependent DEP in xanthene dye-nitroxide radical systems, and measure DEP intensity as a function of solvent molecular size by means of time-resolved and pulsed ESR. The solvent-size dependence of DEP was elucidated by introducing radical-triplet pair mechanism. Since the present study discovered solvent size related DEP generation by laser irradiation, we will move to the next stage, in which we evaluate dynamic nuclear polarization of the solvent surrounding the above mentioned xanthene dye and nitroxide system with some collaborators from overseas by sharing the valuable results of the present study.

研究分野：スピン化学

キーワード：電子スピン分極 キサントン系色素 パルスESR 時間分解ESR ニトロキシドラジカル 三重項消光
ラジカル三重項対 溶媒和

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、NMR 計測の感度増強に核スピン分極 (Dynamic Nuclear Polarization: DNP) を利用する試みが盛んである。DNP は と核スピンの分布差に比例し、NMR 信号強度は DNP に比例する。DNP の利用例には、アルツハイマー病に関わるタンパク質 (アミロイド) の水和圏の水の NMR 観測がある。この研究では、アミロイドにラジカルを化学修飾し、ESR の飽和吸収で電子スピン分極をつくる。電子スピン分極は、Overhauser 効果で水和水に DNP を誘起し、水和水の NMR 観測を可能にした (*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, 11, 6833.)。私は、タンパク質水溶液に DNP で NMR 感度を増大する方法を適用し、タンパク質水和圏の選択的 NMR 観測を実現したいと考えた。

これまで私は、分子の光励起で発生する電子スピン分極 (Dynamic Electron Polarization: DEP) を時間分解 ESR 観測で解明し、活性酸素の寿命測定や励起分子とラジカルの衝突錯体における磁氣的相互作用などに対する特殊な ESR 測定法を開発してきた (総説 *J. Photochem. Photobiol. C*, 2006, 7, 89.)。本研究では、光で発生させた DEP を経由して DNP を誘起する独自の方法の開拓に挑戦したいと考えた。そのため、光励起状態の色素分子とラジカルの衝突で DEP を発生させ、これを色素分子に溶媒和した溶媒分子の核スピんに作用させて、DNP を発生させる現象に着目した。この方法の開拓が実現すれば、試料中の微量成分である水和圏の水を選択的に NMR 観測する装置の開拓が可能になり、溶質分子が感じる特殊な溶媒環境の直接観測が実現する。さらには、光誘起の DNP を利用してタンパク質に付着した水を見ることが可能になる。

2. 研究の目的

液体中における分子の性質は、分子自体のもつ性質に加えて溶媒和圏の液体物性が大きくかわる。この溶媒和圏のみを直接分光観測することが、液体中の分子の諸性質を理解する上で重要であるが、溶媒和と無関係なバルク相液体の桁違いに大きいバックグラウンド信号が分光観測を困難にしている。本研究は、溶媒和圏のみを観測可能とする物理化学的現象の解明とその現象を利用した観測法の開発を目指す。取り扱う現象は、光励起された分子や分子複合系における DEP 発生、および DEP が周囲の溶媒分子に影響して DNP を生じる光誘起 Overhauser 効果である。これにより、溶媒和圏分子のみ NMR 信号を増大させ、溶媒和圏の選択的な NMR 観測を可能にする。この方法の開拓では、大きな DEP の発生がまず始めに重要な課題となる。そのため、様々な色素あるいは色素とラジカルの複合系について、DEP の発生効率の観測を行う。得られた結果をもとに、タンパク質の水和圏観測に優れた色素について、考察を行い、タンパク質構造と水和圏物性の関係の研究に資する分光法のデザインや有用性の検討を行う。

3. 研究の方法

本研究では、将来開発することを目指している溶媒和圏のみを直接観測できる磁気共鳴分光法の実現に向け、必要不可欠な基礎的事項の実験による検討や関連する現象の解明を行う。そのために、分子の光励起による DEP の発生機構の解明を行う。この課題にあたっては、

- (1) キサンテン系有機色素あるいは有機色素とラジカルの複合系試料の調整
- (2) これらの系における光照射で起こる光物理緩和過程の解明
- (3) DEP の発生効率に関するレーザー同期パルス ESR や時間分解 ESR 法を用いた計測
- (4) 計測データの解析に基づいた DEP 発生の理論モデル構築
- (5) DEP が溶媒和分子に引き起こす DNP の評価
- (6) 将来の装置開発実現に向けた優れた DEP 発生システムのデザイン

に研究ステージを分け、順次研究を進めた。

4. 研究成果

本研究で開発する新規な NMR 観測法では、常磁性種の電子スピン角運動量を光照射によって変化させ、強くスピン分極した状態にさせる。これを利用すれば、磁気共鳴観測の感度が大きく向上する。このようなスピン分極の発生には、研究代表者が長年にわたって研究解明してきたラジカル三重項対機構に基づいた現象を利用する。

初年度は、DEP 発生現象の研究を行った。始めにニトロキシドラジカルやガルビノキシラジカルなどの様々な有機ラジカル、および光励起させる色素として水溶性のキサンテン系色素やイオン性官能基の付いたポルフィリンなどを対象とした。これらの物質から、ラジカルおよび色素の組み合わせからなる様々な混合水溶液を調整し、励起光波長に対する透過性や化学的安定性について検討した。その結果、汎用の光源として良く使われる 532nm ナノ秒パルス YAG レーザーを用いた場合に色素のみを選択的に光励起可能な系として、キサンテン系色素とニトロキシドラジカルの系を採用した。

水溶液中のキサンテン系色素に対し、532nm パルスレーザー照射による電子励起状態生成と、そのニトロキシドラジカルによる緩和過程でニトロキシドに発生する DEP の大きさを、時間分解 ESR 法やパルス ESR 法で定量し、電荷移動や電子交換など様々な DEP 発生要因について検討した。この評価にあたっては、過渡吸収法を用いたラジカルによるキサンテン系色素三重項の緩和速度定数の測定やサイクリックボルタンメトリー

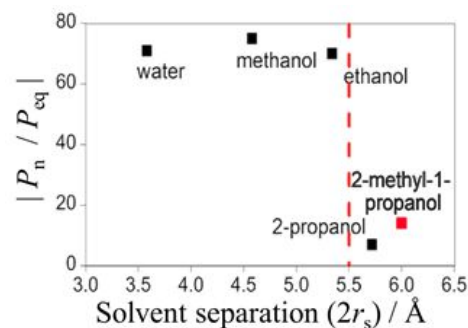
による酸化還元電位の測定などを行った。

2 年目は、研究代表者の人事異動で研究室の引越しがあったため、実験研究を一時的に中断し、当初の 2 年研究計画を 3 年に変更する検討を行った。またこれと平行し、初年度に取得した観測データの解析およびその解釈を適宜行った。この作業での特筆すべき点として、発生する DEP の大きさに著しい溶媒サイズ依存性があることを明確にしたことが挙げられる。キサンテン系色素とニトロキシドラジカルの水溶液は、大きな DEP を生じるため、将来の特殊な NMR 法開拓に有利な系である。一方で、溶媒を水からメタノール、エタノール、2 メチル 2 プロパノールと分子サイズの大きな溶媒に変えていくと、観測されるニトロキシドの時間分解 ESR 信号が弱くなることがわかった。また、キサンテン系色素とニトロキシドの系では、励起三重項の緩和速度定数に溶媒サイズ依存性が見出された。これらの情報を総括し、キサンテン系色素は溶媒和した状態でラジカルと衝突し、エネルギー緩和することを結論した。DEP にこのような明瞭な溶媒サイズ依存性が観測されたことは、キサンテン系色素とニトロキシドの系のスピン分極がこれらの分子の溶媒和圏の情報を得る手がかりになることを示唆し、大変重要な成果であった。

最終年には、観測された DEP の溶媒依存性を定量的に評価し、厳密な DEP 発生モデルの構築を目指した。そのために、パルス ESR 法や標準試料を用いた定量的な時間分解 ESR 法を適宜使用して、様々な溶媒における DEP の大きさ P_n を決定した。上図はこのデータをプロットしたもので、縦軸には、DEP として電子スピン熱分布でのスピン分極を基準にした DEP の大きさである P_n/P_{eq} を示した。また、横軸には、観測に用いた溶媒の量子化学計算によって得られた分子直径を示した。このプロットをみると、DEP の大きさが 5.5 を閾値として、これより大きい溶媒中で急激に小さくなることが明瞭に示されている。この発見については、研究代表者がこれまで解明してきた DEP 発生理論であるラジカル三重項対機構(総説 *J. Photochem. Photobiol. C*, 2006, 7, 89.)をベースに解釈を試みた。ラジカル三重項対機構によれば、ESR 計測時のような磁場下にある試料では、ラジカルと三重項の衝突対における二重項と四重項の電子スピン副準位間にレベル交差があり、これが DEP 発生の主たる原因となる。興味深いことに、このレベル交差が起こるラジカル三重項間距離は、標準的な有機分子では 5~6 となる。この値は今回のプロットデータの閾値 5.5 に良く対応している。すなわち、2 メチル 2 プロパノールのような大きな溶媒では、色素分子に溶媒が付着することでニトロキシドが 5.5 より近い距離まで接近できず、レベル交差が起こらなくなり、DEP の発生がほとんど起きない。一方、水やメタノールのような小さな溶媒では、たとえ色素が溶媒和していても、ニトロキシドは 5.5 より近い距離まで接近することができるので、レベル交差が実現して大きな DEP が発生する。

以上の実験データを考察すると、キサンテン系色素は、溶媒和した状態でニトロキシドと衝突すると推測され、かつ水やメタノール中では極めて大きな DEP が発生するため、色素の溶媒和分子が大きな電子スピン磁化にさらされる可能性が高いと推測される。このことは、キサンテン系色素とニトロキシドの系で、ラジカルに生じた DEP が溶媒和した溶媒分子に Overhauser 効果によって大きな DNP を発生させる可能性が高いことを示唆する。このような本研究の成果は、英国の C.Wedge 博士が行っているキサンテン系色素とニトロキシドの水溶液に対する光照射で水の NMR 信号が増大する研究と関連する。現在、本科研費研究で得た成果を C.Wedge 博士と共有し、将来の特殊な NMR 測定を目指す国際共同研究にむけた準備を始めている。

本研究では、タンパク質の水和圏を解明したいとの思いが強いが、研究期間中にタンパク質表面での DEP 発生まで研究を進めることはできなかった。しかし、アルブミンのような良く知られたタンパク質に対し、その表面にニトロキシドをドープした分子の合成およびその ESR 計測による評価について、研究がすすんでいる。研究期間終了後も研究を継続し、ニトロキシドをドープしたタンパク質の水溶液にキサンテン系色素を添加した試料を調整し、これにレーザー照射した際の DEP 発生を観測する計画である。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) " Foreign Gas Effect on the $b^1\Sigma_g^+ \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ Optical Transition of Molecular Oxygen under High Pressure Conditions", Wataru Kashiwara, Atsushi Shoji, and **Akio Kawai**, *Chemical Physics Letters*, **706**, 715-721 (2018).

DOI: [10.1016/j.cplett.2018.06.060](https://doi.org/10.1016/j.cplett.2018.06.060)

(2) " Exchange interaction of O₂ and nitroxide radical encounter pair as studied by time-resolved near IR luminescence spectroscopy of O₂(¹Δ_g)", Mai Kato, Debora Walker, Tsuyoshi Yoshida, and **Akio Kawai**, Chemical Physics Letters, **706**, 338-342 (2018).

DOI: [10.1016/j.cplett.2018.04.054](https://doi.org/10.1016/j.cplett.2018.04.054)

(3) " Measurements for addition reaction rate constants of organic free radicals to maleic anhydride by means of pulsed EPR spectroscopy with laser excitation", Hirona Takahashi, Kenta Hagiwara, and **Akio Kawai**, Applied Magnetic Resonance, **49**, 813-824 (2018).

<https://doi.org/10.1007/s00723-018-1015-0>

(4) "光で誘起する動的電子スピン分極 ~最近の進展~"、**河合明雄**、高橋広奈
光化学協会誌「光化学」 第49巻 pp.9 - 16, 2018年.

〔学会発表〕(計 9件)

- (1) **招待講演** "Dynamic electron polarization in xanthene dye-TEMPO systems",
Akio Kawai, 4th Kanto Area Spin Chemistry Meeting, Kiryu, Gunma, Japan, Nov. 24th, 2018.
- (2) 「キサントン系色素三重項のニトロキシドラジカルによる消光と電子スピン分極発生の
溶媒依存性」寺岡龍哉, 高橋広奈, **河合明雄**, 第57回電子スピンサイエンス学会,
札幌市, 2018年11月1日.
- (3) **招待講演** "Pulsed EPR study on the quenching of photo-excited Xanthene dye's by
nitroxide radical", **Akio Kawai**, Hirona Takahashi, Toshihiro Tamura, Keisuke Yokoyama,
5th Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and
Materials Science Oriented Applications, The Awaji Island, Hyogo, Japan, Jun 19th, 2017.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)
取得状況 (計 0件)

〔その他〕
無し

6. 研究組織

(1)研究分担者
無し

(2)研究協力者
研究協力者氏名：高橋 広奈
ローマ字氏名：Hirona Takahashi

研究協力者氏名：付 哲斌
ローマ字氏名：Fu Zhebin

研究協力者氏名：寺岡 龍哉
ローマ字氏名：Ryuya Teraoka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。