

令和元年6月13日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19096

研究課題名（和文）界面選択的レーザー温度ジャンプ法の開拓

研究課題名（英文）Development of Interface Specific Laser Temperature Jump Spectroscopy

研究代表者

奥野 将成（Masanari, Okuno）

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：00719065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、界面におけるタンパク質の二次構造を、ヘテロダイン検出キラル振動和周波発生（Vibrational Sum Frequency Generation: VSFG）分光法で研究した。キラルVSFG分光法は、バルク相および界面のキラリティーについて活性なため、界面選択性が問題であった。本研究では、入射光および信号光の偏光を用いることにより、信号光の空間的な起源（バルク相もしくは界面）を決定することに成功した。また、アミドI信号とヘリックスおよびシートの配向の関係を導出した。これにより、キラルVSFG分光法を界面選択的かつ二次構造選択的な手法として用いることができることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、界面選択的な分光法を用いることで、タンパク質などの界面での性質を明らかにすることを目指した。タンパク質はヘリックスやシートなど、キラリティー（鏡像）を持つ。これまでに、界面選択的かつキラリティーを検出できる手法は存在しなかった。近年開発されたキラル振動和周波発生分光法は、界面のキラリティーを高感度に検出可能である。本研究では、キラル振動和周波発生の信号発生について、バルク相に由来するのか、界面に由来するのかを容易に決定できる手法を提案した。また、界面での二次構造の分子配向と、キラル振動和周波発生信号の符号の相関を研究した。

研究成果の概要（英文）：Secondary structures of proteins at proteins were investigated by hetero-dyne detected chiral vibrational sum frequency generation spectroscopy. Chiral VSFG spectroscopy detects not only chirality of bulk but also that of interfaces. In this study, it was found that polarization dependence of chiral VSFG signals can be used for distinguishing the origin of chiral VSFG signals. Poly-lactic thin films, whose thicknesses were estimated to be several nm and several hundreds nm, were measured as a model of interfaces. Experimentally, it was shown that the PSP (P-polarized VSFG, S-polarized S visible, and P-polarized infrared) signal is similar to the SPP signal in that of the sign and amplitude in the reflection geometry as the simulation suggested. Relationships between molecular orientations of secondary structures and the signs of chiral VSFG signals were also partially elucidated in this study.

研究分野：分子分光学

キーワード：界面・表面 キラリティー 二次構造 タンパク質 偏光

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

1. 研究開始当初の背景

分子の振動スペクトルは「分子の指紋」と呼ばれるように、分子の構造情報を豊富に含んでいる。バルク相においては、赤外吸収分光やラマン分光とレーザー温度ジャンプ法を併せて用いることにより、反応中間体の二次構造やフォールディングにおける反応経路などに関する情報が得られている。一方、脂質膜と水などのバルク相の界面は、ペプチド・タンパク質の反応場として非常に重要である。これは、生体膜周辺でさまざまな生体化学反応が効率的に起きていることから明らかである。しかし、高い界面選択性をもって、界面におけるペプチド・タンパク質のフォールディング・アンフォールディングを担うダイナミクスを観測できる分析手法は存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、界面選択的な分子分光手法である振動和周波発生 (Vibrational Sum Frequency Generation: VSFG) 分光法を用い、界面におけるペプチド・タンパク質のフォールディング・アンフォールディングを測定可能な装置開発およびこれらの分子の構造変化のダイナミクスの追跡を観測することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、 $1.45 \mu\text{m}$ に水分子の持つ OH 伸縮振動 (3400 cm^{-1} : 波長 $\sim 3 \mu\text{m}$) の倍音に由来する吸収帯に着目し、熱励起を行うことを目標とした。その吸収帯に合致する波長のレーザー光を照射すると、水分子はレーザー光を吸収し、直ちに熱エネルギーに変換することため、試料の温度を上昇させることができる。これが水を溶媒とした場合のレーザー温度ジャンプ法の原理である。そのレーザーによる分子の温度ジャンプと、界面選択的な分光手法であるヘテロダイン検出 (キラル) 振動和周波発生分光法を組み合わせることによって、フォールディング・アンフォールディングに伴う分子・官能基の絶対配向、および高次構造に由来するキラリティーの変化に着目した。それに伴い、まず研究代表者が開発した手法であるヘテロダイン検出キラル振動和周波発生分光法で得られる、タンパク質のアミド I バンドおよび NH 伸縮振動バンドの符号と、ペプチド・タンパク質の界面における分子配向の関係については全く未解明であることから、それらの関係を明らかにすることを試みた。また、水溶液をキラル VSFG 分光法で測定したときに、キラルな分子がバルク相にも界面にも存在するため、界面選択的に得られているかどうか不明である。その判別を可能にする手法を提案した。

4. 研究成果

界面における分子のダイナミクスとして、配向の変化があげられる。本研究ではまず、分子配向とヘテロダイン検出キラル振動和周波発生 (VSFG) で得られる信号の関係についての研究を行った。成果としては以下があげられる。

1. モデルペプチドの二次構造とキラル VSFG の信号の相関について、従来の研究で提案されている関係を検討し、さらにそれらの信号の符号を世界で初めて決定した。これまでの研究により、逆平行シート構造を持つ分子からはアミド I および NH 伸縮振動の信号がともに観測される一方、ヘリックスでは NH 伸縮振動の信号しか観測されない、という関係が提案されていた。本研究では、モデルペプチドとして poly-benzyl-L-glutamate をヘリックスを形成する分子として、合成ペプチドでありロイシンとリシンの繰り替えしからなる K(LK)_7 を逆平行シートを形成するモデルペプチドとして測定した。水上にモデルペプチド溶液を滴下して形成した Langmuir 膜 (L 膜) および溶融石英基板上に累積した Langmuir Blodgett 膜 (LB 膜) を、アミド I 領域および NH 伸縮振動領域において測定した。その結果、 K(LK)_7 からは両領域において明瞭な信号が検出されたにもかかわらず、PBLG からはアミド I 領域から信号は検出されなかった。NH 伸縮振動領域については、再現性の問題があり、引き続き検討中である。得られた信号はすべて正の符号を持っており、これは本研究で初めて得られた知見である。

2. 上記における研究において、逆平行シート構造から得られたアミド I および NH 伸縮振動領域の正の信号について、分子配向との関係が考えられたため、量子化学計算を用いた検討を行った。逆平行シート構造をアミド構造へと還元し、各アミド構造に含まれる振動モードを、位相を考慮して足し合わせることによって、逆平行シート構造のラマンテンソルおよび双極子モーメントから超分極率を計算した。その超分極率を用いて分子配向を考慮することで、二次非線形光学感受率を計算した。その結果、シート構造のなす平面が、界面に対して平行な場合に強いアミド I 信号が 1630 cm^{-1} 付近を発生することが示唆され、実験結果をよく再現できることがわかった。一方、ヘリックスについては、ヘリックスの軸が界面に対して平行な場合には、アミド I 信号が発生しないことが示唆された。このように、ヘリックスの軸およびシート構造の平面が界面に対して平行という構造は、界面における分子配向として自然であると考えられる。

3. キラル VSFG 信号が界面から発生しているのか、バルク相から発生しているのかを判別する手法として、偏光組み合わせを用いることを提案した。フレネル係数を考慮することで、試料を反射配置で測定し、可視光と赤外光を co-propagating 配置で入射した場合、PSP (P-偏光 VSFG 光、S-偏光可視光、P-偏光赤外光を表す) 偏光配置で測定して得られる信号強度と、SPP 偏光配置で測定して得られる信号強度の比が、判別の指標となることを示した。電子非共鳴条件下で、界面に信号が由来しているときにはこれらの信号が同程度になることを示した。一方、バルク相に由来する場合、SPP 信号は PSP 信号は著しく小さくなることを示した。実際に、ヘリックスのようならせん構造をとるポリマーのスピンコート薄膜を測定し、SPP 信

号と PSP 信号の強度がほぼ同程度であり、信号が界面に由来していることを示した。この手法をモデルペプチドの単分子膜 (L 膜) にも応用し、SPP 信号と PSP 信号が非常に似通っていたことから、キラル VSFG 信号光が界面相に由来していることを示した。

4. 上記のように、界面における二次構造および分子配向を反映し、高い界面選択性を得られる HD-キラル VSFG 信号を用いて、温度ジャンプ測定を行うことが本研究の目的であった。そのため、温度ジャンプ用のレーザーの検討・選定を行った。従来の温度ジャンプ測定では、大きな尖頭出力を持ったナノ秒レーザーを重水素セルなどに集光することによって得られる誘導ラマン効果によって 1.56 μm の波長を持つレーザーを得ていた。しかしこの手法では、レーザー光強度を安定させるのが難しく、かつ大掛かりで高圧の重水素ガスセルを必要とするという欠点があった。特にこのポンプ光の安定性は、時間分解信号の安定性に反映されるため、非常に重要である。本研究ではより安定かつ容易に、レーザー温度ジャンプ法を行うため、1.56 μm の波長を持つナノ秒パルスレーザーを熱励起レーザーとして検討した。このナノ秒ファイバーレーザーは尖頭出力が低いものの、繰り返しが可変であり、非常に安定である。本研究期間中には十分な温度ジャンプ測定まで到達しなかったため、今後さらなる検討を行う予定である。また、界面だけでなくバルク相を対象とした実験も興味深く、検討の余地がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

奥野将成, 石橋孝章, ヘテロダイン検出キラル振動和周波発生分光法とそのバルクおよび界面試料への応用, 分光研究, 査読あり, 67 1-10 (2018)

Masanari Okuno and Taka-aki Ishibashi, Bulk-or-Interface Assignment of Heterodyne-Detected Chiral Vibrational Sum Frequency Generation Signal by Its Polarization Dependence, Journal of Chemical Physics, 査読あり, 149, 244703 (2018) DOI.org/10.1063/1.5063290

Naoki Takeshita, Masanari Okuno and Taka-aki Ishibashi, Development of Heterodyne-detected Total Internal Reflection Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy and its Application to CaF_2 / Liquid Interfaces, Journal of Physical Chemistry C, 査読あり, 121, 25206-25214 (2017) DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b08212

Masanari Okuno, Daisuke Ishikawa, Waka Nakanishi, Katsuhiko Ariga and Taka-aki Ishibashi, Symmetric Raman Tensor Contributes to Chiral Vibrational Sum Frequency Generation from Binaphthyl Amphiphile Monolayers on Water -Study of Electronic Resonance Amplitude and Phase Profiles-, Journal of Physical Chemistry C, 査読あり, 121, 11241-11250 (2017) DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b12664

Naoki Takeshita, Masanari Okuno and Taka-aki Ishibashi, Molecular Conformation of DPPC Phospholipid Langmuir and Langmuir-Blodgett Monolayers Studied by Heterodyne-detected Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy, Physical Chemistry Chemical Physics, 査読あり, 19, 2060-2066 (2017) DOI: 10.1039/C6CP07800A

[学会発表](計 8 件)

Taka-aki Ishibashi, Masanari Okuno, Chiral VSFG Spectroscopy of Polylactic Acid Films, 第 8 回 SFG 研究会、2018 (招待講演)

板垣信人, 奥野将成, 石橋孝章, 既知の二次構造を持つモデルペプチド界面の HD-キラル VSFG 分光, 第 12 回分子科学討論会, 2018

板垣信人, 奥野将成, 石橋孝章, モデルペプチド界面の二次構造と気水界面の HD-キラル VSFG 信号の相関の研究, 日本分光学会年次講演会, 2018

奥野将成, 石橋孝章, バルク中および空気/溶液界面におけるポルフィリン J 会合体のキラリティー, 第 11 回分子科学討論会, 2017

鍛治美里, 奥野将成, 石橋孝章, ヘテロダイン検出振動和周波発生分光法による抗菌ペプチド - グラミシジン - の L 膜および LB 単分子膜の構造の研究, 第 11 回分子科学討論会, 2017

近藤正人, 奥野将成, 井上圭一, 神取秀樹, 石橋孝章, 振動和周波発生分光で観るナト

リウムポンプロドプシンの気水界面での構造および配向変化ダイナミクス, 第 11 回分子科学討論会, 2017

鍛治美里, 奥野将成, 石橋孝章, HD-VSFG 分光法による界面での抗菌ペプチド - グラミジン - の構造の研究, 日本分光学会年次講演会, 2017

Taka-aki Ishibashi, Masanari Okuno, Asian Spectroscopy Conference,

Heterodyne-detected chiral VSFG spectroscopy: New, sensitive vibrational chiroptical technique for bulk and interface samples, 2017 (招待講演)

〔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〕

ホームページ等

6 . 研究組織

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。