

## 様式 C-19

# 科学研究費助成事業(科学研究費補助金)研究成果報告書

平成23年5月25日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20612019

研究課題名(和文) 生体分子イオンビーム貯蔵リングによる分子-電子・光子衝突過程の研究

研究課題名(英文) STUDY OF ELECTRONIC AND PHOTONIC COLLISIONS WITH MOLECULES USING A STORAGE RING FOR BIOMOLECULAR IONS

研究代表者

田辺 徹美(TANABE TETSUMI)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・名誉教授

研究者番号：20013394

研究成果の概要(和文)：静電型イオン貯蔵リングを用いて生体分子イオンと電子、光子の相互作用を研究した。DNA陽イオンやS-S結合(Sは硫黄)をもつペプチド陽イオンと電子の衝突では、それぞれ4.5 eVおよび6 eV付近に電子捕獲解離による強い共鳴が観測された。また、緑色蛍光蛋白質発色団の負イオンにレーザー光を照射し光吸収解離過程を観測した。光によって励起されたイオンの寿命はイオンの貯蔵時間に依存する。これは入射されたイオンの緩和過程によるものである。

研究成果の概要(英文)：Electron-ion and photon-ion interactions were studied for various biomolecules by using an electrostatic storage ring. For the electron collisions with DNA cations and S-S bonded peptide cations, strong resonances originated from electron-capture-dissociation were observed at around 4.5 and 6 eV, respectively. Furthermore, with the laser irradiation, photo-dissociation processes were studied for GFP (green fluorescent protein) chromophore anions. The lifetimes of photoexcited anions depend on the storage time of ions. This is due to the relaxation process of precursor ions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：加速器科学、原子分子物理学

科研費の分科・細目：量子ビーム科学

キーワード：加速器、静電型イオン貯蔵リング、原子・分子物理、電子-イオン衝突、電子捕獲解離、光解離、生体分子、気相

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 1990年代初頭からはじまったクーラーリング(電子冷却装置を備えたイオン貯蔵リング)による原子、分子物理学の研究は著しい発展を遂げた。それまで行われてきた一回通過(single pass)型の実験にくらべ

て、①高ルミノシティ、②高分解能、③低バックグラウンド、④電子とイオンの相対速度をゼロから広い範囲にわたって変えることができる、⑤振動励起した分子イオンを貯蔵することによって基底状態にすることができる、など多くの新しい特徴があった

ためである。とりわけ、旧東大原子核研究所のクーラーリング TARN II では分子イオンの研究がはじめて行われ、電子冷却装置の超伝導型へのグレードアップによる電子温度低下と相まって数々の新しい現象が発見された（たとえば、T. Tanabe *et al.*, Phys. Rev. Lett. **70** (1993) 422, *ibid.* **75** (1995) 1066, *ibid.* **83** (1999) 2163)。

(2) これらの研究は主に軽い分子イオンが対象であった。一方、従来の磁場を用いたリングでなく、電場で構成されるリングであれば、静電剛性がイオンの質量に依存しないことから、あらゆるイオンを同一のパラメータで貯蔵することができる。また、上記特徴の②を除いて磁場型リングの特徴を継承することができる。2000年に行われた KEK (高エネルギー加速器研究機構) の田無からつくばへの移転にともなって、それまで培ってきた TARN II での技術を活かして新たに静電型イオン貯蔵リングを建設した。特に、貯蔵ビームの寿命が短いという最初の Aarhus 大学における静電リングの問題点は KEK のリングによって解決された (T. Tanabe *et al.*, Nucl. Instr. and Meth. A **482** (2002) 595)。このリングでは質量 66,000 に至る各種生体分子イオンを貯蔵し (T. Tanabe *et al.*, Nucl. Instr. and Meth. A **496** (2003) 233)、さらに電子標的 (冷却装置と同一の構造) を設置し (T. Tanabe *et al.*, Nucl. Instr. and Meth. A **532** (2004) 105)、世界的にもはじめて生体分子イオンと電子の衝突研究が行われた。

(3) 生物学の研究はめざましい発展をとげている。しかし、応用が主体で原子レベルの素過程にまで遡る理解は不十分であり、現象が何故起こるかといった疑問に対する回答は今後の大きな課題である。従来、生体分子イオンによる電子捕獲、解離の研究は、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (FTICR) 質量分析装置によって行われてきた。この種の実験では、強磁場をかけたイオントラップに蓄えられたイオンに電子を混ぜて、ある一定時間経過した後にできるイオンの質量をイオンサイクロトロン共鳴周波数の測定によって決定する。この方法は生成イオンの質量を正確に決定できるという長所がある。しかし、衝突エネルギーが正確にわからないことや反応生成率を定量的に決めることが難しい。これに対して本研究で用いる方法は、本質的に“ビーム実験”であるために衝突エネルギーを正確に決定できる上に生成粒子の測定に定量性がある。さらに、FTICR 法では検出できない中性粒子を測定できるという長所がある。ただし、生成イ

オンの質量測定は可能であるがその精度は前記方法に劣る。この点に関しては FTICR と本研究で用いる方法は相補的關係にある。既に KEK の静電リングでは、生体分子イオンと電子の衝突に関するいくつかの重要な研究が行われた：タンパク質の電子による解離はタンパク質の質量分析に欠くことができない。未知の分子を分解して既知の分子の集合に分け、データベースと照合することによって元の分子の質量を求めるものである。ペプチド (小さなタンパク質) 正イオンと電子の衝突では、ペプチド結合が特定の衝突エネルギーで共鳴的に切断される現象が発見された (T. Tanabe *et al.*, Phys. Rev. Lett. **90** (2003) 193201)。また、電子による DNA の破壊は遺伝情報の喪失を招くので、放射線損傷や放射線治療の分野から大きな関心が寄せられている。多価 DNA 負イオンと電子の衝突では、中性粒子放出反応のしきい値がイオンの価数に比例して約 10 eV のステップで増加する現象を発見した。これは、DNA 分子の中の電子の集団運動 (プラズモン励起) に起因すると推定される (T. Tanabe *et al.*, Phys. Rev. Lett. **93** (2004) 043201)。さらに DNA 正イオンと電子の衝突では、DNA 塩基同士の積層 (stacking) の強さに比例して共鳴状電子捕獲が起こる現象を発見した (T. Tanabe *et al.*, Chem. Phys. Lett. **430** (2006) 380)。

## 2. 研究の目的

(1) 現在この種の研究ができる装置は KEK と Aarhus 大学のリングであるが、前者が電子とイオンを合流 (merging) させる方式であるのに対して後者は交差 (crossing) させる方式をとっている。合流型は電子の厚みが桁違いに厚いためにルミノシティが高く、反応断面積の小さな現象でも容易に測定できる為に KEK がこの分野の研究をリードしている。生体分子イオンは種類が豊富であるが、さらに Na などの金属イオンを付加したもの、水のクラスターを付加したものなど生物現象との関連で興味深い多くの分子が存在する。本研究では生物現象の中でも重要な分子を取り上げて電子-分子の衝突研究をさらに発展させる。

(2) 一方、光と生体分子の反応も重要な研究の柱である。貯蔵リングでは分子イオンが光を吸収して分解するプロセスを用いることによって生体分子イオンの光吸収過程を高い感度で測定することができる。この方法は光解離スペクトロスコーピーと呼ばれている。従来の研究では、試料として溶液を用いたために溶液中で中性分子とイオンが混在

して光はその両者に吸収され複合スペクトルとなったが、本研究ではイオンだけを抜き出して研究することができる。このような光子と生体分子イオンとの衝突研究を新たに開始する。この種の研究は Aarhus 大学のリングが先行しているが、KEK の方が生体分子イオンビームの強度が強いという特徴があるためにさらなる貢献が期待できる。

以上の研究は、物理学だけでなく、化学、生物学とも密接に関連しているために、物理学だけでなく質量分析や放射線損傷の研究分野からも関心が寄せられている。このように本研究は生体分子と電子・光子の衝突に関する基礎研究に大きく貢献するものと考えられる。

静電型リングは世界的に流行の兆しがある。すなわち、Aarhus 大学と KEK に加えて首都大学東京でも建設されたが、さらに Max Planck 研究所 (Heidelberg) と M S I 研究所 (Stockholm) では 4 K 以下の極低温に冷却できるリングを建設中である。また、Frankfurt 大学でも常温型を建設中である。KEK のリングは未開拓であった生体分子に焦点をしばって電子・光子との相互作用のメカニズムを解明することを目指しているのも、後発の機関から大きな関心が寄せられている。

### 3. 研究の方法

(1) 装置全体 (T. Tanabe *et al.*, Nucl. Instr. and Meth. A **482** (2002) 595) を図 1 に示す。

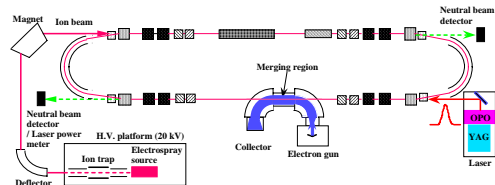


図 1 静電型イオン貯蔵リング。図の左下にエレクトロスプレーイオン源、イオントラップ、左端に質量分析装置が描かれている。イオンはリングの左側から入射する。また、リング中央下に電子標的、右端下にレーザー装置が設置されている。反応生成物はリング左端下および右端上の中性粒子検出器によって検出される。

実験方法は、まず、生体分子試料を水とメタノールの混合溶液に溶かし、pH を調整するために少量の酸やアルカリを加え、これをエレクトロスプレーイオン源にセットする。イオン源で生成されたイオンは、イオントラップに貯蔵し強度を増強した後、パルスビーム

として 20 kV の加速管へ送られる。ここで加速されたイオンは、質量分析装置で電荷と質量が正確に選別され、目的とするイオンだけが静電リングに入射される (T. Tanabe *et al.*, Nucl. Instr. and Meth. A **496** (2003) 233)。リング内部の真空度は  $10^{-11}$  Torr 位の超高真空である。

(2) 電子とイオンの衝突実験では、リング内を周回するイオンは電子標的 (T. Tanabe *et al.*, Nucl. Instr. and Meth. A **532** (2004) 105) と衝突する。衝突の結果放出される中性粒子はリングの左端に設置した中性粒子検出器によって検出される。検出器は micro channel plate (MCP) である。電子のエネルギーを細かく変えて励起関数を測定する。また、検出器 MCP のアノードにあたる粒子の位置や個数を読み取ることもできる (2D イメージング)。電子エネルギーは、ECR (electron cyclotron resonance) イオン源 (図では省略) によって生成される軽い分子イオンの解離性再結合を利用して校正される。すなわち、分子イオンと電子の速度が一致した場合に解離断面積が最大となり、一方でイオンの速度は予め正確にわかっているのも、したがって電子の速度がわかることになる。電子エネルギーが校正できるという点はマーキングビーム法の大きな特徴である。

(3) 図 1 に示したように、電子に加えて新たに光子と生体分子イオンの衝突研究を行うためにレーザー装置が設置されている。YAG および波長可変 OPO レーザー (215-2550nm) を用いて、可視光領域の光を静電リングに導入しイオンビームに照射し、波長をスキャンする。また、レーザー照射後遅延して生成される中性粒子を測定するために、リングの右端にも中性粒子検出器 (MCP) を設置する。すでに述べた左端の検出器を使わない理由は、強いレーザー光照射による検出器の損傷を避けるためである。ビーム入射→レーザー発光→中性粒子検出、計数→波長変更という一連の流れを自動的に繰り返す。イオン源で生成される生体分子イオンは振動回転励起している。レーザーを照射する前にこれらの励起状態を緩和するために予めイオンをイオントラップや静電リングに貯蔵することができる。

### 4. 研究成果

(1) 電子と生体分子イオンの衝突  
① プラス 1 価の DNA 2 量体イオンビームと電子ビームの衝突によって放出される中性粒子の生成率を電子のエネルギーを変えて測定した。図 2 のように衝突

によって放出される中性粒子の衝突エネルギー依存性は、典型的な電子捕獲解離のパターンを示す。すなわち、中性粒子生成率はゼロに近い低エネルギーで増加し、且つ、より高いエネルギーで共鳴状のバンプを持つ。プロトンが付加したアデニン (dAA) とグアニン (dGG) について4.5eV付近に強い共鳴が観測された。この共鳴はシトシン (dCC) では弱くなり、チミン (dTT) では全く観測されない。その原因を追究するために、分子力学の計算でこれらの分子イオンの構造を求めた。その結果、dAAでは二つのアデニン塩基が接近しているのに対してdTTではチミン塩基が離れているという大きな相違が判明した。さらに、これらの分子に $\text{Na}^+$ を付加したプラス1価のイオンについて同様の実験を行った。その結果、 $\text{Na}^+$ の付加によって共鳴強度が強まることがわかった。

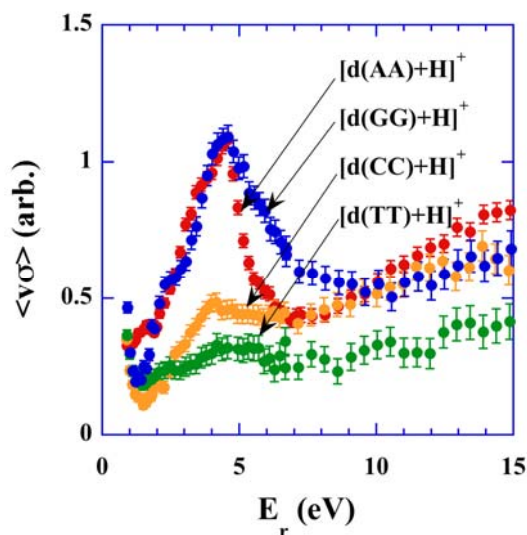


図2 電子とDNA陽イオンの衝突で放出される中性粒子生成率の衝突エネルギー依存性

特にdTTの場合は $\text{Na}^+$ 付加によって新たに4.5eV付近の共鳴が現れる。分子力学による構造との比較によって、この原因は $\text{Na}^+$ 付加によって2つの塩基が接近したためであることが判明した。このように共鳴が塩基同士の相互作用と密接に関連していることがわかった。また、図3のように $\text{Na}^+$ イオンだけでなく、 $\text{Li}^+$ や $\text{K}^+$ イオンでも同様の現象が起ることが確認できた。

これらの結果は Chem. Phys. Lett. **467** (2008)154 および J. Phys. **194** (2009) 012029 に掲載するとともに国際学会 (ICPEAC 2009) で発表した。

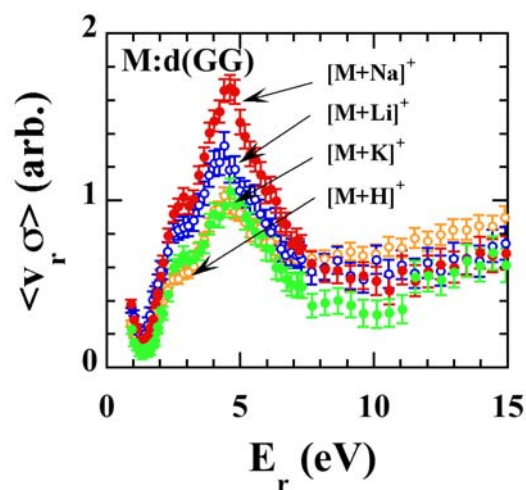


図3 電子とアルカリ金属イオンを付加したDNA d(GG)陽イオンの衝突で放出される中性粒子生成率の衝突エネルギー依存性。

② S-S (Sは硫黄) ボンドはタンパク質構成上の重要な分子結合である。S-S結合を持つペプチド陽イオンに電子が衝突し、吸収される場合にS-S結合が切断される。この現象は衝突エネルギーがゼロ付近で起ることが知られていたが、新たに6eV付近でも起ることを発見した。

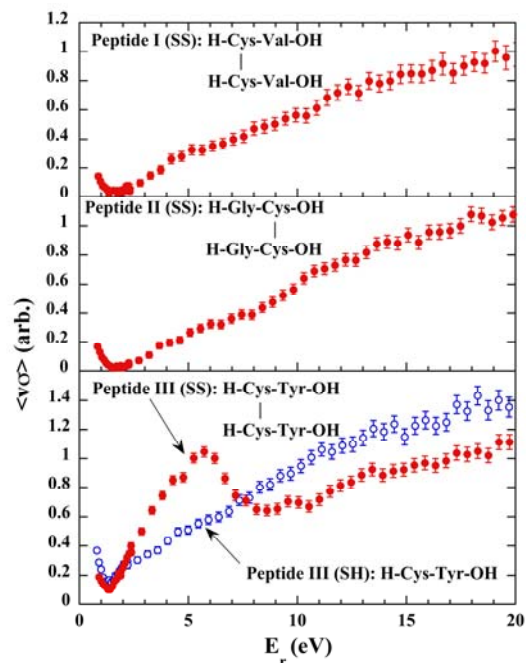


図4 電子と各種SS, SHペプチド陽イオンの衝突で放出される中性粒子生成率の衝突エネルギー依存性

このような切断はS-S結合を持つ全てのペ

プチドで起るのでなく、図4のように硫黄を含むアミノ酸残基 Cysの隣に Tyrなどのパイ電子に富むアミノ酸残基が存在する場合に強く起ることがわかった。生体分子イオンの電子捕獲解離は現在ホットトピックスであり、この発見の意義は大きい。

これらの結果は Chem. Phys. Lett. **504** (2011) 83で発表した。

これまでの研究は1eV以上の高いエネルギー領域で行われてきたが、1eV以下で反応断面積が増大することが知られている。電子エネルギーを1eV以下に下げることが必ずしも容易でないかもしれないが今後の興味深い研究課題である。

## (2) 生体分子イオンの光吸収解離

生体分子が光を吸収し分解する現象は古くから知られているが大部分は液相での研究で、気相での研究は少ない。一方、イオン貯蔵リングを用いればこの現象を気相で、高感度で測定できる。従来、イオン貯蔵リングでの研究はパルスレーザーの発光間隔 100 ms に同期させてイオンを入射していた。一方、分子イオンはイオン源で生成された時点では多くの振動回転励起状態を含んでいる。このような励起イオンも真空中で長い間貯蔵することによって励起状態を緩和させることができる。本研究では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発色団 (chromophore) 負イオンを秒オーダーに及ぶ長い時間貯蔵することによって、光吸収後の励起イオンの寿命がのび (図5)、光吸収スペクトルが変る現象を発見した。図6に見られるように貯蔵時間が長くなるとスペクトルの幅が狭くなる。

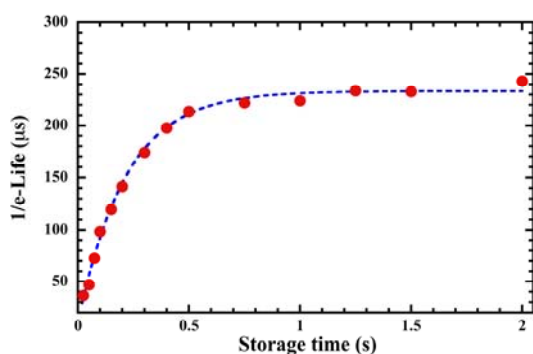


図5 レーザー (波長: 480 nm) によって励起された GFP chromophore 負イオンの寿命。横軸はイオントラップでの貯蔵時間

このことによって、より精密な吸収スペクトルが観測されることになる。これまで緩和過程は必ずしも重要視されてこなかったが、この研究結果は分子の緩和が精密分光にと

って重要であることを指摘したことになり、この分野の研究に及ぼす意義は大きい。

これらの結果は Eur. Phys. J. D **62** (2011) 191で発表した。

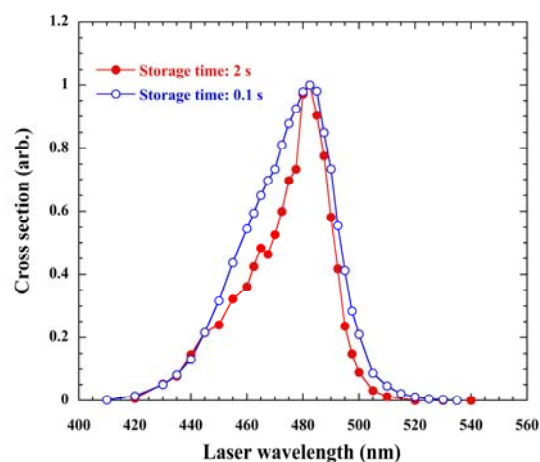


図6 GFP chromophore 負イオンの光解離スペクトル。貯蔵時間によってスペクトルの幅が変わる。貯蔵時間が0.1sと2sの場合が示されている。

以上の研究では、イオンをイオントラップに貯蔵してきたが、トラップの真空度は  $10^{-6}$  Torr 台で必ずしも良くない。従って、貯蔵中に再励起する可能性もある。トラップのかわりに超高真空の静電リングで貯蔵すればより低温の分子イオンになることが期待できる。今後このような実験が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Tetsumi Tanabe, Manabu Saito, Koji Noda, Relaxation of green fluorescent protein chromophore anion observed by photodissociation in an electrostatic storage ring, The European Physical Journal D **62**, 191-195 (2011) 査読有
- ② Tetsumi Tanabe, Koji Noda, Satoshi Miyagi, Noriyuki Kurita, Shigenori Tanaka, Julia Setzler, Wolfgang Wenzel, Evgeni B. Starikov, Gianarelio Cuniberti, Resonant neutral particle emission in collisions of electrons with protonated peptides with disulfide bonds at high energies Chemical Physics Letters **504**, 83-87 (2011) 査読有

③ Tetsumi Tanabe, Evgeni B. Starikov,  
Koji Noda,  
Resonant neutral-particle emission in  
collisions of electrons with protonated  
and sodiated nucleotide monocations in  
a storage ring  
Journal of Physics: Conference Series  
194, 0120291-6 (2009) 査読有

④ Tetsumi Tanabe, Evgeni B. Starikov,  
Koji Noda,  
Resonant neutral-particle emission  
correlated with base-base  
interactions in collisions of  
electrons with protonated and  
sodiated dinucleotide monocations  
Chemical Physics Letters 467,  
154-158 (2008) 査読有

[学会発表] (計4件)

① 田辺徹美、斉藤 学、野田耕司  
静電リングによる生体分子イオンの光吸  
収実験、  
日本物理学会第66回年次大会、平成23  
年3月27日、新潟大学五十嵐キャンパス

② 田辺徹美、斉藤 学、野田耕司  
静電リングに貯えられた生体分子イオン  
の光吸収、  
日本物理学会第65回年次大会、平成22  
年3月23日、岡山大学津島キャンパス

③ T. Tanabe, E. B. Starikov, K. Noda,  
Resonant neutral-particle emission in  
collisions of electrons with protonated  
and sodiated nucleotide monocations in  
a storage ring,  
XXVI International Conference on  
Photonic, Electronic and Atomic  
Collisions (ICPEAC2009), 平成21年7  
月23日, Kalamazoo, Michigan, U.S.A.

④ 田辺徹美、野田耕司、斉藤 学、E. B.  
Starikov,  
生体分子イオンビームと電子ビーム  
の衝突：電子のエネルギーに共鳴して  
こわれる生体分子、  
日本物理学会第64回年次大会、平成  
21年3月30日、立教大学池袋キャン  
パス

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田辺 徹美 (TANABE TETSUMI)  
大学共同利用機関法人高エネルギー加速  
器研究機構・名誉教授  
研究者番号：20013394

### (2) 連携研究者

野田 耕司 (NODA KOJI)  
独立行政法人放射線医学総合研究所・重  
粒子医科学センター・加速器開発室長

研究者番号：80228329

斉藤 学 (SAITO MANABU)  
京都府立大学・生命環境科学研究科・准教  
授

研究者番号：60235075