

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24年 6月 4日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21750007

研究課題名（和文） パルス中性子回折による酵素反応等の水素移動機構解明

研究課題名（英文） Direct Observation of Hydrogen Transfer during the Model for Enzymatic Reactions by Pulsed Neutron Diffraction Analysis.

研究代表者

細谷 孝明 (HOSOYA Takaaki)

茨城大学・工学部・助教

研究者番号：80435601

研究成果の概要（和文）：

光照射によって可逆的に反応を起こし色が変化するサリチリデンアニリン誘導体の水素移動機構を解明するため、水素を高精度に観測できる中性子回折測定を行った。まず、サリチリデンアニリン誘導体の重水素化を行い、長辺 0.8mm、薄さ 0.1mm の薄い単結晶を作成することに成功し、単結晶の体積も稼ぎつつ、全体の光反応率を稼いだ。これを大強度陽子加速器施設 J-PARC に設置された単結晶中性子回折装置 iBIX を用いて、単結晶中性子回折を行い、十分な中性子回折強度を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

N-Salicylideneanilines are well known to exhibit photochromism (from yellow to red) in the solid state. To observe the hydrogen atom transfer during the photochromic reaction clearly, we carried out the neutron diffraction measurement at BL03 iBIX in J-PARC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：中性子回折、結晶相反応、水素・プロトン移動、J-PARC

1. 研究開始当初の背景

水素原子は有機分子や生体分子における基本構成要素であり、水素結合ネットワーク、水和構造などを理解することが、物質の化学結合や反応性を理解する上で非常に重要である。そのためには正確に水素原子の位置を決定する必要があり、従来単結晶中性子構造解析が、最も確実に水素原子の位置を決める

ことのできる重要な分析手法として、重金属原子に直接水素原子が結合した金属ヒドリド錯体における水素原子位置の詳細決定や、結晶中に水素結合ネットワークをもつ有機化合物における水素結合構造の詳細決定などの研究が行われており、最近では [NiFe] ヒドロゲナーゼのモデル化合物である NiRu 錯体の単結晶中性子構造解析から Ni-Ru 間を架橋する水素原子の存在を明らかにする

ことによって [NiFe] ヒドロゲナーゼの酵素活性機構を提唱するなどの研究が行われている。

一方、有機化合物の反応機構を解明するために結晶相反応の解析を用いるという研究が行われてきた。結晶相反応とは、単結晶状態を保ったまま結晶中で進行する化学反応であり、結晶格子中というきわめて束縛された環境下で進行することから、同様に束縛環境下で進行する酵素反応のモデルとして注目されている。また、結晶相反応は化学反応に伴う分子構造の変化を単結晶構造解析法によって直接観察できるため、原子の三次元座標や熱的挙動から化学反応を議論でき、非常に興味深い系である。このような反応において、原子半径も小さく質量の軽い水素原子は最も大きく動き得る原子であることから、反応に伴うその動きを追跡することが結晶相反応の機構を解明するうえで非常に重要となる。このような状況に対し、本研究代表者は現在までに、水素原子やプロトンを明確に観察でき、反応中の標識として反応物に導入する重水素原子との識別が極めて容易な中性子回折に注目し、有機光反応に伴う水素移動を立体的に観察し、X線や分光法では観察が困難な反応機構を明らかにしてきたが、単結晶中性子回折法を利用する上で、必要な単結晶試料の一边が1 mm 角という非常に大きなものであるため、結晶作成が困難であること、巨大結晶の内部まで光が届かないなどの原因で結晶相反応自体が十分に進行しないことなどの問題で、単結晶中性子構造解析が可能な結晶相反応は、一部の系に限られてきた。

一方、J-PARC で本研究代表者らが建設中の単結晶回折計である茨城県生命物質構造解析装置 iBIX では国内単結晶回折計の100倍程度の測定効率を見込んでおり、必要な単結晶の大きさが実験室系の単結晶X線回折測定レベルの一边0.3 mm 程度ですむため、上記問題が解決され、多様な反応系が研究対象となる。さらにiBIXでは高分解能領域($d_{min} \sim 0.5 \text{ \AA}$)、高時間分解能($1 \mu\text{s}$)の測定が可能であるため、結晶相反応の過程で結晶中に生じる反応中間体や励起状態といった不安定化学種の、水素原子を含めた構造の観察が期待できる。また、iBIXで用いる飛行時間型中性子ラウエ回折法は、X線ラウエ回折で行われてきたタンパク質分子の酵素反応等の反応中間体の直接観察や時間分割測定による構造変化の追跡による反応機構解明の研究で問題となるような、異なる波長のX線によるブラッグ回折が同時に起こってピークが重なり、データの欠損を引き起こすこともないため、測定効率が高く、格子定数の大きな結晶も測定が可能である。

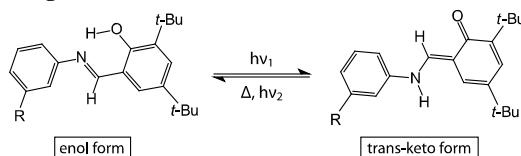
2. 研究の目的

J-PARC に稼働する茨城県生命物質構造解析装置 iBIX を用いて、パルス中性子ラウエ回折測定による有機光反応および単純な酵素反応機構の解明を試みる。iBIX は波長範囲 $0.68 \sim 3.86 \text{ \AA}$ を持つ次世代パルス中性子単結晶回折計であり、有機低分子から格子定数が 135 \AA までの生体高分子等をカバーする。

当面は、J-PARC の出力が弱く、酵素分子等の格子定数の大きな試料では十分な精度の回折データが得られない上、利用できるマシントイムも少ないため、短時間で測定が可能な試料(低分子など)で反応中間体や準安定体の構造解析を試みる。そこで、まず水素の挙動が重要であると思われる酵素反応を取り上げ、モデルとなる反応系を構築する。そして、その反応中間体の構造を中性子回折法、X線回折法、NMR 分光法の実験科学的手法を組み合わせて解析することで、時間分割飛行時間型中性子ラウエ回折法による結晶中の反応における水素挙動の立体化学的に解明する方法の基礎を開発する。反応中間体の安定化については、すでにX線による有機化合物の反応中間体および金属錯体の励起構造の解析などで用いられているクライオトラップ法、すなわち温度を下げることなどにより反応中間体などをトラップする手法を用いることを考えている。

3. 研究の方法

短時間で測定が可能な試料を対象に、パルス中性子回折測定による反応中間体や準安定体の構造解析から、水素移動機構の解明するアプローチを取る。試料は格子定数の小さな低分子、とりわけ化学反応の制御が容易なものを選ぶ。例えば、可視・紫外光で可逆的にプロトン移動を伴って着色体へと構造変化を起こし、結晶の色が変化するフォトクロミズム反応がある。本研究では特に、結晶状態を保ったまま反応が進行し、水素・プロトンの移動が関与する、サリチリデンアニリン(SA)に注目した。SAはSchiff塩基の化合物で、常温で安定な黄色のエノール体結晶に紫外光を照射することで、ヒドロキシル基の水素から窒素原子にプロトンが移動し、自転車のペダルをこぐようにして赤色のトランス・ケト体(着色体)へと互変異性化する(Fig.1)。



このトランス・ケト体は可視光照射や常温

静置ですぐさまエノール体へ戻る。また、プロトンの移動が反応開始時に行われており、その移動を観察することが反応機構を議論する上で、非常に重要である。現在トランス・ケト体の構造解析に成功している報告例では、その割合が10%程度で、移動後の水素、つまり N-H の水素を直接観察するには至っていないため、単結晶中性子構造解析が期待されている。また、この SA の結晶は光照射により表面が反応するだけで、結晶の中心部まで反応に必要な波長の光が届かない。今までの中性子回折が要求する結晶は数 mm 角であるため、反応率を稼ぐことは極めて困難であった。レーザーの2光子吸収を用いて反応に必要な光の倍の波長（結晶に吸収能がない波長帯）の光を当てることで、結晶全体における着色体の割合を増やすことで構造解析（非水素原子）に成功した報告もあるが、現在中性子回折の施設にレーザー光を引き込み、測定することは困難であった。また、常温で不安定な着色体を捉えるには低温下で測定する必要があるが、反応率10%程の着色体を十分に解析できるほどの精度を持ち、低温装置が使用でき、さらに1週間ほどで測定が可能な装置は現在までに存在しない。iBIX では必要な試料サイズが0.5mm 角と実験室計 X 線レベルで十分であることと、冷却装置や照射光源などの試料環境装置を備え付けることを踏まえて設計がなされており、反応制御（光源は紫外光源を考えている）が行えるため、着色体の高精度な構造解析が期待できる。また、水素の非干渉性散乱によるバックグラウンドを低減するため、試料合成の段階から重水素置換を行っていく。以上の研究を元に、パルス中性子回折による水素移動機構研究のノウハウを蓄積する。

4. 研究成果

本研究の手法の最大の特徴である中性子回折法は、本研究で用いるサリチリデンアニリン誘導体のような有機物の試料に多く含まれる水素原子からの非干渉性散乱によってバックグラウンドが増大し、大幅にデータの S/N 比が下がってしまう。一方、水素原子の同位体である重水素原子は非干渉性散乱がほとんどなく、回折強度に寄与する弾性散乱能も高い。本研究ではサリチリデンアニリン誘導体を結晶中で互変異性反応を起こし、その反応後あるいは反応途中を中性子回折で構造解析を行うため、結晶中に未反応の分子（エノール体）と生成物分子（トランス・ケト体＝着色体）が混在して結晶全体の回折強度が減衰することが予想される。エノール体とトランス・ケト体を精度よく構造解析し、水素原子の移動を直接観察するためには、バックグラウンドを低く抑えてデータの S/N 比

を上げる必要がある。そこでまず、水素原子を可能な限り重水素原子に置き換えた試料化合物を合成するスキームの調査、検討を行った。C-H 結合のような共有結合の水素原子まで含めての重水素化であるため、多ステップの有機合成が必要となったが、サリチリデンアニリン誘導体の完全重水素体を合成するスキームを構築することができ、軽水素体によるテスト合成に成功した。また、平行して可視・紫外光源による粉末結晶への光照射条件決定や単結晶中性子回折に不可欠な単結晶作成（～1mm）を水素体で成功した。一方、エノール体とトランス・ケト体を精度よく構造解析し、水素原子の移動を直接観察するためには、できるだけ着色体であるトランス・ケト体の占有率、すなわち単結晶全体の反応率をあげる必要がある。一方で、サリチリデンアニリン誘導体は、単結晶状態で光照射を行う場合、単結晶の表面のみで反応が進行し、内部は未反応のまま残ってしまう。とくに単結晶中性子回折ではミリメートルレベルの大きな単結晶を必要とするため、とくに反応率が低くなる。そこでサリチリデンアニリン誘導体の単結晶をできるだけ薄くすることを試み、長辺 0.8mm の大きさを持ちながら、0.1mm 程度の薄い結晶を作成することに成功した。これを大強度陽子加速器施設 J-PARC の物質・生命科学実験施設 MLF に設置された単結晶中性子回折装置 iBIX を用いて、単結晶中性子回折を行った。測定は1日1フレームと長時間行い、十分な中性子回折強度を得ることに成功した。

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2件）

- ① 細谷孝明, 大原高志 『化学における単結晶中性子構造解析』 RADIOISOTOPES, Vol. 59, No. 4, 279-287, 2010, 査読有
- ② Tanaka I, Kusaka K, Hosoya T. (他7名、3番目) 『Neutron Structure Analysis Using the IBARAKI Biological Crystal Diffractometer (iBIX) at J-PARC』 *Acta Crystallogr D*, Vol. 66, 1194-1197, 2010, 査読有

〔学会発表〕（計2件）

- ① Takaaki HOSOYA 『Preliminary Neutron Powder Diffraction Analysis of a Meta-stable Colored Form in Photochromic Crystal using iMATERIA in J-PARC』 IUCr2011 (XXII Congress of the International Union of Crystallography), 2011.8.27, Madrid, Spain.
- ② Takaaki HOSOYA 『Developments for Upgrades of 2-Dimension Scintillator Detector System,

Data Acquisition Electronics and Software for
J-PARC』 IUCr2011 (XXII Congress of the
International Union of Crystallography),
2011.8.28, Madrid, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細谷 孝明 (HOSOYA TAKAAKI)

茨城大学・工学部・助教

研究者番号：80435601