

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21750032

研究課題名（和文） 溶液ジェット法による糖薄膜の製膜と真空紫外円二色性データベースの構築

研究課題名（英文） Fabrication of saccharides films by solution-jet beam deposition technique and circular dichroism measurement in the vacuum ultraviolet region.

研究代表者

田中 真人 (TANAKA MASAHIITO)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・研究員

研究者番号：30386643

研究成果の概要（和文）：本研究は真空紫外線領域における円二色性スペクトル計測による糖鎖構造解析の実用化を将来目標としており、その基礎として単糖など比較的容易に入手可能な糖試料の真空紫外円二色性スペクトル計測とそれに先立つ溶液ジェット法などの糖薄膜試料作製装置の開発や高感度な真空紫外円二色性計測装置の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：In this work, we developed the method for fabricating the saccharides thin film by the solution-jet beam deposition techniques and the system for measuring the circular dichroism spectra in the vacuum ultraviolet region with high sensitivity, and measured the vacuum-ultraviolet circular dichroism spectra of several saccharides thin films. By increasing the understanding of circular dichroism of saccharides, the conformational analysis of polysaccharides can become by the circular dichroism study in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分光学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：原子・分子物理、物性実験、光物性、糖、化学物理、放射光

1. 研究開始当初の背景

糖・糖鎖といった物質はその重要性にも関わらず、現在までその立体構造などの解析手法が確立していなかった。特に糖鎖は癌やアルツハイマー病、インフルエンザなどの多くの疾病に関与しているため、これら糖鎖の立体構造解明は各種疾病の予防、治療に大きく貢献すると考えられる。

これらの立体構造を知る手段の一つとして円二色性を計測することが上げられる。円二色性はキラリティや高次構造に敏感に応

答するため紫外域ではタンパク質の二次構造決定などに広く利用されている。

タンパク質同様に重要な生体分子である糖・糖鎖などはその円二色性が真空紫外線領域にしか発現しないため、ほとんど円二色性研究はなされてこなかった。しかしながら近年申請者らや広島大のグループなどが放射光を用いた真空紫外円二色性測定システムの開発に成功し、糖水溶液試料の真空紫外円二色性測定も多少ではあるが行われるようになってきていた。

真空紫外円二色性測定から、糖の構造については糖鎖などの高分子の立体構造に関する知見を得ることができると考えられる。例えば単糖類の一種であるペントース ($C_5H_{10}O_5$) 類水溶液の真空紫外領域の吸収、円二色性測定結果から、これら4種のペントースの吸収スペクトルはほとんど同一であるが、真空紫外円二色性スペクトルは明確な差異が見られることがわかっている。これら分子の分子構造の違いは主に OH 基の位置のみであり、真空紫外円二色性が糖の構造の僅かな変化に非常に敏感であることをこの結果は示している。

円二色性計測から立体構造を知る方法として、1) 構造既知物質の円二色性データベースを構築し、その結果から構造を決定する。2) 量子力学計算結果との比較から、構造を決定する、という2つが用いられている。いずれの方法においても、データベースの数だけでなく、一つ一つの試料において出来る限り広い波長領域で円二色性スペクトルを計測することが重要である。

広範囲な波長領域において真空紫外円二色性を測定するためには、薄膜が最も適した試料形態といえる。薄膜試料では溶媒による吸収が無いために、広い波長領域に渡ってスペクトルを測定することができる。例えば申請者らはアミノ酸薄膜の作製および波長40nm までの真空紫外円二色性測定と計算を行い、実験結果と計算結果との対応づけに成功している。この手法を糖にも適用することで、糖構造と真空紫外円二色性スペクトルを対応づけたデータベースが構築できると期待できる。

また溶液状態では α 体、 β 体が混在するため、得られる円二色性はこれらアノマーなどの足し合わせとなり、分子構造と円二色性の関連付けが困難である。薄膜などの固体状態では純粋な α 体、 β 体の試料の作製も可能であるために、分子構造と円二色性の関連付けが容易であり、データベースの構築において最も適しているといえる。しかしながら今までに糖薄膜の作製例はほとんどない。

2. 研究の目的

そこで本研究課題は糖薄膜を溶液ジェット法等の手法で作製し、その真空紫外領域の円二色性スペクトル計測ならびにその基礎データベースの蓄積を目的とし、将来的な糖鎖の構造解析へと繋げていくことを目指すものである。

薄膜を試料とすることで、水溶液と比べて広い波長範囲の円二色性スペクトル測定が可能になり、より多くの分子構造情報を得ることが出来る。構造既知の糖・糖鎖試料の円二色性と構造を対応づけた構造未知試料の将来的な構造解析に資する基礎的なデータ

ベース構築を行う。

また糖試料は一般的に円二色性強度が弱いために、そのような弱い信号も感度良く計測するためのシステムの開発も行う。

本研究の遂行を将来的には糖鎖構造解析へとつなげていき、糖鎖の構造解明による各種疾病の予防や治療へ貢献していきたく考えている。

3. 研究の方法

まず糖薄膜の作製手法として、溶液ジェット法を用いるものを開発した。糖は熱に不安定であるため、一般的な抵抗加熱法などによる製膜は困難であった。熱に不安定な試料の製膜法として、溶液ジェット法と呼ばれるものが近年開発されている。この方法は真空中に溶液を噴霧して液滴を作り、それらを基板に堆積させ溶媒を蒸発させることで薄膜を作る方法である。この方法を用いて、例えば真空蒸着できないイオン性液体であるシアニン色素などの薄膜作製が行われている。その他にも一般的な抵抗加熱やレーザーアブレーションなどの手法もこれらの手法が適用可能な糖の種類において利用した。

真空紫外円二色性スペクトル測定は産業技術総合研究所の放射光施設 TERAS のビームライン BL-5B にて行った。

糖試料では円二色性信号が小さいことが予想されるため、感度向上のために光弾性変調器を用いた円二色性測定システムの高度化も行った。既に整備されている偏光アンジュレータ光源と組み合わせることで更なる高感度が期待でき、高精度・高効率な糖試料の真空紫外円二色性測定を可能にした。

また直線異方性の影響がないことを確認するため、真空紫外円二色性スペクトルの試料回転角度依存性も測定した。

4. 研究成果

2009 年度は主に溶液ジェット法による糖薄膜の製膜装置の開発および高感度真空紫外円二色性スペクトル計測手法の確立を行った。開発した溶液ジェット法による糖薄膜の製膜装置の概要を図1に示す。

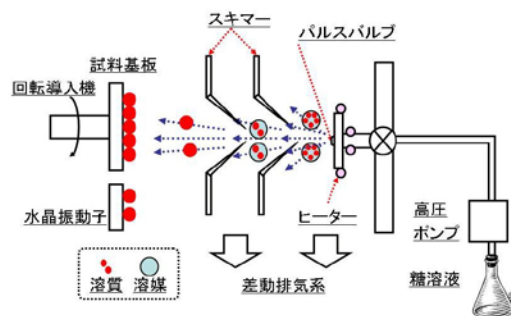


図1 溶液ジェットによる薄膜試料作製装置の概要

糖の溶液をクロマトグラフィー用の高圧ポンプならびにパルスバルブを通じて真空中に噴霧する。液滴は2つのスキマーを通過して、基板にまで到達する。このときパルスバルブは溶液の水結による目詰まりを防ぐため、ヒーターで加熱・温度制御しておく。試料基板(CaF₂基板等)に薄膜を数十 nm 程度の膜厚で製膜する。この時、試料基板は真空状態を保ったまま回転導入機とモーターで面内回転させることで、出来る限り均一な薄膜作製を行うことができる。また水溶液の噴霧の場合、一般的な油回転ポンプでは短時間で油中に水が混入し、排気が不可能になる。そこで液体窒素トラップによる水の除去や水に強いドライポンプの採用などにより長時間での製膜を可能にした。バルブ開閉時間・ポンプ圧等の製膜条件を調整し、例えばアラビノースなどの糖薄膜の製膜に成功した。

高感度な真空紫外円二色性計測システムの構築にも成功した。このシステムは放射光施設TERASのビームラインBL-5Bにて、光弾性変調器を用いて開発した。既に整備されている偏光アンジュレータ光源と組み合わせた新規円二色性測定システムの構築に成功し、計測感度を従来のアンジュレータによるものよりも約10倍以上向上させることに成功した。測定波長領域は光弾性変調器の光学材料であるCaF₂が透過可能な波長135nm程度までである。通常円二色性システムは直線偏光子を用いて直線偏光にした後、光弾性変調器を用いて左右円偏光にするが、本システムでは偏光アンジュレータからの直線偏光を直接用いている。この方法では直線偏光の向き(鉛直もしくは水平偏光)を自由に変えることができる。それぞれの直線偏光の向きで試料由来の円二色性信号は符号が反対に、それ以外の偽の信号(ベースライン)の多くは同じ符号で検出されるため、それらの差を取ることでベースラインを出来る限り排除した正確な円二色性スペクトルを計測することが出来る。

2010年度は2009年度までに開発した溶液ジェット法による糖薄膜作製装置や高感度真空紫外円二色性スペクトル計測装置などを用いて、糖薄膜試料の真空紫外円二色性計測を進めた。

例えば最も一般的な糖であるグルコース薄膜の作製を行い、その α 体、 β 体の薄膜の波長140nmまでの真空紫外円二色性スペクトルの計測などを行った。この時、直線異方性の影響がないことを確認するため、真空紫外円二色性スペクトルの試料回転角度依存性を測定した。その結果本薄膜において円二色性計測に直線異方性の寄与はほぼ存在し

ないことが分かった。

本測定の結果、グルコース薄膜の真空紫外域での光吸収は α 体、 β 体といったアノマー間での違いはほとんど見られないが、円二色性スペクトルは大きく異なる形状を示していることがわかった。アノマー間の分子構造の差異は一部の水酸基の位置が主であることから、真空紫外円二色性スペクトルはこのような糖の僅かな構造の変化に敏感に反応することを如実に示している。

また単糖だけでなくシクロデキストリンと呼ばれる α -D-グルコースが6~8個環状に結合した糖の薄膜作製とその β -シクロデキストリンの真空紫外円二色性スペクトルの測定にも成功し、グルコース間の結合によって、円二色性スペクトルがどのように変化するかなどを調べた。

以上のように当初の研究実施計画に即した研究成果を得ることに成功した。本研究の成果を将来的には真空紫外円二色性計測を基にした糖鎖の構造解析手法の実用化へと発展させていく。これによって糖鎖の構造解明によるインフルエンザ等の各種疾病の予防や治療・製薬開発等のバイオサイエンス分野などへの多大な寄与や多くの知的財産獲得がもたらされると考えられる。

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 田中 真人、偏光アンジュレータを用いた生体分子の円二色性分光、放射線化学、査読有、vol. 91、2011、pp. 51—55
- ② 田中 真人、渡辺 一寿、金子 房恵、中川 和道、Chiroptical Study of α -Aliphatic Amino Acid Films in the Vacuum Ultraviolet Region、Journal of Physical Chemistry A、査読有、vol. 114、2010、pp. 11928—11932
- ③ 田中 真人、渡辺 一寿、金子 房恵、中川 和道、Present status of vacuum ultraviolet natural circular dichroism measurement system using polarizing undulator at TERAS BL5 beamline、Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena、査読有、vol. 181、2010、pp. 177—180
- ④ 田中 真人、生体分子の放射光円二色性分光研究、放射光、査読無、vol. 23、2010、pp. 128—131

[学会発表] (計11件)

- ① 田中 真人、渡辺 一寿、金子 房恵、中川

- 和道、真空紫外自然円二色性分光による脂肪族アミノ酸の溶液・固体状態での構造変化、第24回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、つくば国際会議場（茨城県）、2011年1月10日
- ② 田中 真人、渡辺 一寿、中川 和道、生体分子構造解析を目指した真空紫外円二色性計測ビームラインTERAS BL5の現状、第53回放射線化学討論会、名古屋大学（愛知県）、2010年9月22日
- ③ 田中 真人、渡辺 一寿、中川 和道、偏光アンジュレータを用いた極紫外～真空紫外領域におけるアミノ酸薄膜の自然円二色性測定、第4回分子科学討論会、大阪大学（大阪府）、2010年9月15日
- ④ 田中 真人、渡辺 一寿、金子 房恵、泉 雄大、田邊 真依子、安居院 あかね、室 隆桂之、櫻井 浩、剣持 祐介、本田 康、波田 雅彦、中川 和道、Natural circular dichroism in the vacuum ultraviolet and soft x-ray regions by using polarizing undulator、22nd International Symposium on Chirality、札幌コンベンションセンター（北海道）、2010年7月15日
- ⑤ 田中 真人、渡辺 一寿、金子 房恵、櫻井 浩、剣持 祐介、本田 康、波田 雅彦、中川 和道、真空紫外～極紫外線領域における生体分子薄膜のCD初計測と分子構造解析への展開、モレキュラー・キラリティー2010、札幌コンベンションセンター（北海道）、2010年7月11日
- ⑥ 田中 真人、渡辺 一寿、泉 雄大、安居院 あかね、室 隆桂之、中川 和道、Recent Status of Circular Dichroism Measurement System using Polarizing Undulator in Vacuum Ultraviolet and Soft X-ray Regions、Hiroshima International Workshop on Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy、広島大学（広島県）、2010年3月5日
- ⑦ 田中 真人、渡辺 一寿、泉 雄大、安居院 あかね、室 隆桂之、中川 和道、Natural Circular Dichroism Study of Biomolecules in Vacuum Ultraviolet and Soft X-ray Regions using Polarizing Undulator、The 14th Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation、広島大学（広島県）、2010年3月4日
- ⑧ 田中 真人、渡辺 一寿、中川 和道、産総研TERASにおける極紫外～真空紫外領域に対応した自然円二色性測定ビームラインの現状、第23回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、イーグレ姫路（兵庫県）、2010年1月9日
- ⑨ 田中 真人、生体分子の放射光円二色性分光研究、第23回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、イーグレ姫路（兵庫県）、2010年1月7日
- ⑩ 田中 真人、渡辺 一寿、中川 和道、Present status of vacuum ultraviolet natural circular dichroism measurement system using polarizing undulator at TERAS BL5 beamline、11-th International Conference on Electronic Spectroscopy and Structure、奈良県新公会堂（奈良県）、2009年10月6日
- ⑪ 田中 真人、渡辺 一寿、中川 和道、偏光アンジュレータを用いた極紫外領域における円二色性スペクトルの初測定、The Symposium on Chiral Science and Technology Mesochemistry and Chemical Wisdom、早稲田大学（東京都）、2009年9月24日

〔その他〕

ホームページ、
<http://staff.aist.go.jp/masahito-tanaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 真人 (TANAKA MASAHITO)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・研究員

研究者番号：30386643