

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0167

研究課題名(和文)リアルタイム超高速分光でみる化学反応と遷移状態制御

研究課題名(英文) Observation of chemical reaction and control of transition state by real-time ultrafast spectroscopy

研究代表者

寺本 高啓 (Teramoto, Takahiro)

大阪大学・工学研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：40467056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：合成化学などの化学反応は、ミリ秒以上の長い時間スケールで反応が進行する。この反応は遷移状態理論を用いた統計的アプローチ、マクロな速度論で記述できる。しかしマイクロには反応中もフェムト秒の時間スケールで分子は正に振動しており、その遷移状態の鞍点を越えようとしている瞬間を目撃するのは化学に携る研究者の夢であるといえる。

本研究では、秒、分、時間、日などのタイムスケールで起こる化学反応を時空間的にリアルタイム計測ないし制御するための手法として、超短パルスレーザーを用いた超高速分光法の高速度化を行った。また化学反応の可視化を行うリアルタイム顕微イメージング手法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したリアルタイム超高速分光法を用いることにより、様々な化学反応をフェムト秒スケールで可視化することができる。例えば付加的なレーザー光を照射することにより、分子振動を強制励振したり、電子励起を引き起こすなどして、化学反応の制御を可能とすることが予想される。また軟X線顕微鏡を用いたリアルタイム顕微イメージングでは、光合成により発生する酸素の細胞内外への拡散プロセスを可視化することに成功している。本手法を用いれば、例えば細胞内での活性酸素による細胞内でのダメージの影響などマクロな生体内化学反応が可視でき、それに拮抗する方法を模索するツールとして使用することなど実用的な展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chemical reactions such as synthetic chemistry proceed on a long time scale of milliseconds or more. This reaction can be described by a statistical approach using transition state theory, and macroscopic kinetics. However, the molecule vibrates on the femtosecond time scale during the reaction, and it is a dream of the chemists to see the time when it will go beyond the saddle point of its transition state in the reaction.

In this research, we speed up ultra-fast spectroscopy as a method for spatio-temporally real-time measurement or control of chemical reactions that occur on time scales such as seconds, minutes, hours, and days. We also succeeded in developing a real-time microscopic imaging method to visualize chemical reactions in the cell.

研究分野：物理化学

キーワード：超高速分光

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

1. 研究開始当初の背景

近年のレーザー技術の発展に伴い、パルス幅が 10fs 以下の超短パルス光を発生することが容易となりつつある。超短パルスを用いて過渡吸収分光を行うと、分子の振動周期よりもパルス幅が短いため分子が励振され、時間領域の過渡吸収スペクトルに信号の変調として分子振動が重畳される。そのため超短パルスを用いた超高速分光から電子状態の緩和ダイナミクスに加え瞬時的に起こる分子振動モードの変化や動的な相互作用の詳細を明らかにすることができる。

申請者はこれまでにピコ秒レーザーを光反応開始光源として用いた、ダブルポンプ・プローブ型の超高速分光システムの開発を行った。これにより、光励起から 100ns 経過した後の 3 重項電子励起状態にある Chrysene 分子や 6-nitroBIPS の光開裂反応の結果生成される merocyanine の超高速分光を行うことに世界で初めて成功した。このように申請者は光化学反応のフェムト秒の励起ダイナミクス、反応中間体、反応生成物の超高速分光に成功している。しかしながら、超高速分光で観測する時間レンジに関しては申請者が構築したシステムの 1ms が世界最長であり、それ以上長い時間レンジの研究報告例はない。

合成化学などの化学反応は、ミリ秒以上の長い時間スケールで反応が進行する。この反応は遷移状態理論を用いた統計的アプローチ、マクロな速度論で記述できる。しかしミクロには反応中フェムト秒の時間スケールで分子は正に振動しており、その遷移状態の鞍点を越えようとしている瞬間を目撃するのは化学に携る研究者の夢であるといえる。またそれと同時に近年の顕微鏡技術向上に伴い、高解像度の顕微イメージングが行われるようになってきた。この手法を用いるとリアルタイムで化学反応に伴う空間的な変化を観測することができる。

2. 研究の目的

本研究では、秒、分、時間、日などのタイムスケールで起こる化学反応を時空間的にリアルタイム計測ないし制御する手法の開発を行う。そのため、超短パルスレーザーを用いた超高速分光法の高速化技術の開発を行う。また化学反応の可視化を行うリアルタイム顕微イメージング手法の開発を行う。

3. 研究の方法

可視超短パルスレーザーの高強度化および計測・制御系の高速化

可視領域 (520 - 760nm) の超短パルスレーザー (パルス幅 <10fs) を有している。本研究で観測する信号強度が高い S/N 比を有するほうが好ましいため、比較的高強度安定化したレーザーを用意することが望ましい。レーザーの高強度化のため、pump 光の波面傾斜による光パラメトリック過程における位相整合条件の改善を考えた。正三角プリズムを光パラメトリック過程における pump 光 (波長 400nm) の光路中に導入し、pump 光の波面を傾斜することを行う。

実験の測定時間が長期化すると、レーザーの不安定性 (強度、スペクトル、位置安定性など) により、欲しい信号にそれと同等あるいはそれ以上のノイズ成分が含まれ問題となる。そこで、この制御システムの見直しを行い、リアルタイム計測システムを構築する。

軟 X 線顕微鏡による細胞内元素分布の可視化と光合成発生酸素の直接観察

照明光源として「水の窓」と呼ばれる軟 X 線 (波長: 2.3~4.4 nm) を用いた軟 X 線顕微鏡は、1). 波長が短いため高い空間分解能 (<100nm) が達成可能、2). 厚み 15 μm 程度までの試料は断片化を行わずに観察可能、3). C や N など軽元素の内殻 1s 軌道に由来する吸収があるためタンパク質など生体関連分子を元素選択的に観察できる、といった特徴を持つ。これらにより軟 X 線顕微鏡では、生きたままの細胞を色素標識や断片化などの前処理を行わずに高分解能で顕微観察することができる。

糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 は窒素固定を行う原核光合成生物である。その形態は細胞が 1 次元に連なった糸状体であり、多くは光合成を担う栄養細胞であるが、10 個に 1 個程度の割合で窒素固定に特化した異型細胞 (ヘテロシスト) を持つ。ヘテロシストと栄養細胞は、どちらも単独では窒素欠乏環境下で生育できず、ヘテロシストが固定した窒素をアミノ酸として栄養細胞に供給し、栄養細胞はヘテロシストに糖や有機酸などの光合成産物を供給している。栄養細胞からヘテロシストへの分化は、栄養細胞中の特定の有機酸の蓄積が引き金となると考えられており、同時に細胞内の炭素窒素比 (C/N 比) も大きく変化していると考えられている。しかし、これまでに C/N 比を単一細胞レベルで実測した例はなく、ヘテロシスト形成に必要な C/N 比の閾値など、細胞内の C/N 比と細胞分化の定量的な関係は不明である。

本手法では、窒素 K 吸収端前後における軟 X 線を用いた軟 X 線顕微分光法により、生きた細胞における C/N 比の直接決定法を提案・開発した。さらにそれを用いて、光合成発生する酸素の直接観察を試みる。

4. 研究成果

可視超短パルスレーザーの高強度化および計測・制御系の高速化およびそれを用いた超高速分光

超短パルスレーザーの高強度化を行った結果、プリズムに対する入射角を調整することにより、位相整合を満たす波長が変わることがわかった。その結果、従来の 10 倍程度のレーザー強度を得ることに成功した。ただこのとき、レーザーのパルス幅が 12fs 程度と若干パルス幅が伸びて

しまった。おそらく光パラメトリック増幅時における非線形光学結晶に起因する高次の分散の影響であると考えられる。対策としてパルス圧縮部分におけるプリズム対の距離および入射角を調整することにより、パルス幅を 10fs 程度に圧縮することができた。さらに検出系の高速化として、ハードウェアは従来と同じであるが、LabVIEW で構築した制御プログラムに様々な新しい機能等や関数を導入し高速化を図った。その結果、従来と同じ実験条件に要する計測時間を 1/10 の 6 分に短縮することに成功した。

改良した超高速分光システムを用いて、グラファイト (HOPG) を対象として超高速分光を行った。

検出法は E - O サンプリグ法である。図 1B に反射率変化の実時間追跡の結果を示す。光照射から 50fs あたりまで信号が立ち上がり、140fs 程度の寿命をもって減衰することがわかった。この信号をフーリエ変換することにより、関与する格子振動モードを特定することができる (図 1C)。1600 cm^{-1} 付近に見られる格子振動が G モードに由来する信号である。他の信号はノイズ成分である。短時間フーリエ変換解析を行うことにより、格子振動の時間発展を調べると図 1D のように時間とともに格子振動モードが緩和し、振動数が低波数にシフトすることが確認できた。

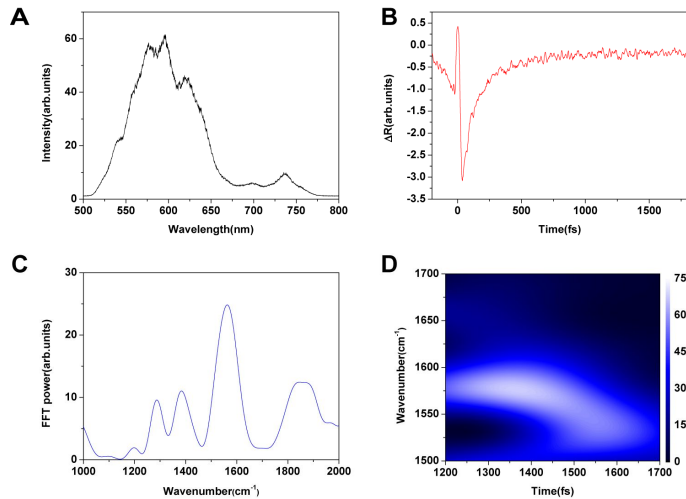


図 1 . グラファイトのコヒーレントフォノン分光 (A)可視超短パルスレーザーのスペクトル(B)グラファイトの反射率変化の実時間追跡.(C)(B)をフーリエ変換したもの(D)(B)の短時間フーリエ変換.

軟 X 線顕微鏡による細胞内元素分布の可視化と光合成発生酸素の直接観察

キャピラリーに封入したシアノバクテリアの軟 X 線透過観察を行った (図 2A)。キャピラリー軸を 4 度ずつ回転させ、45 枚の透過画像から逆ラドン変換を行うことによってシアノバクテリアのトモグラフィー顕微画像を得た (図 2B)。この計測を窒素 K 吸収端前後の 2 つの波長で行った。

窒素 K 吸収端近傍の軟 X 線に対し、吸光度に寄与する細胞の構成元素は C と N に限定できる。そのため吸光度 $A(\lambda)$ は $A(\lambda) = (\epsilon_C(\lambda)C_C + \epsilon_N(\lambda)C_N)l$ と記述できる。ここで $\epsilon_i(\lambda)$ 、 c_i はそれぞれ元素 i (i は C または N) の吸収断面積と濃度、 l は光路長である。2 つの異なる波長での吸光度の比から以下のような関係式が得られる。ここで R は C/N 比である。

$$\frac{A(\lambda_1)}{A(\lambda_2)} = \frac{\epsilon_C(\lambda_1)R + \epsilon_N(\lambda_1)}{\epsilon_C(\lambda_2)R + \epsilon_N(\lambda_2)} \quad (1)$$

$$R = \frac{C_C}{C_N} \quad (2)$$

これらの式を用いて、軟 X 線トモグラフィー吸収画像の解析を行うことにより、細胞内の C/N 比 (図 2D)、C (図 2E) および N (図 2F) の可視化に成功した。

またこの手法を用いて、光合成発生酸素の直接可視化を行うことに成功した。

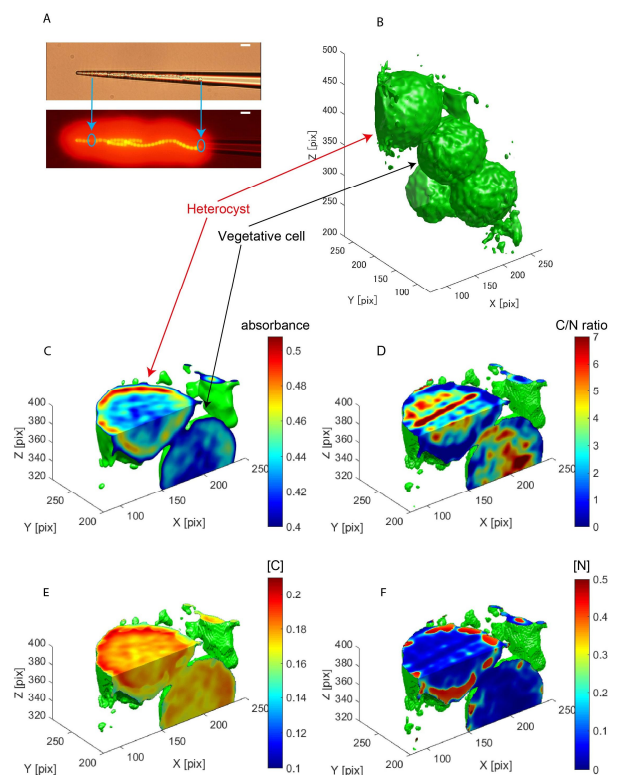


図 2 . 糸状性シアノバクテリアの軟 X 線トモグラフィー (A)キャピラリーに封入したシアノバクテリアの光学および蛍光顕微画像 (B) シアノバクテリアの軟 X 線トモグラフィー画像 (C)(B)の断面図 およびその C/N 比(D) C 濃度(E), N 濃度(F)マッピング.

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- [1]. **T. Teramoto**, C.Azai, K.Terauchi, M.Yoshimura, and T.Ohota, "Soft X-Ray Imaging of Cellular Carbon and Nitrogen Distributions in Heterocystous Cyanobacteria", *Plant Physiology*, vol.177, p.52-61(2018) 査読有
- [2]. **T. Teramoto**, M.Yoshimura, C.Azai, K.Terauchi, and T.Ohota, "Determination of carbon-to-nitrogen ratio in the filamentous and heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 with single-cell soft X-ray imaging", *Journal of Physics Conference Series*, vol.849, p.012005-1-4(2017) 査読有
- [3]. **寺本高啓**, 岡田美智雄, 末田敬一, 宮永憲明, "銅酸化物薄膜の生成と物性解明", 大阪大学レーザーエネルギー学研究センター 平成 28 年度共同利用・共同研究成果報告書, P.79-80(2017) 査読無
- [4]. **寺本高啓**, 大山 浩, 末田敬一, 宮永憲明, "インパルスプラズマ散乱振動蛍光分光法の開発", 大阪大学レーザーエネルギー学研究センター 平成 28 年度共同利用・共同研究成果報告書, P.151-152(2017) 査読無

〔学会発表〕(計 12 件)

- [1]. **寺本 高啓**, "軟 X 線イメージングによる生きたシアノバクテリアの細胞内元素分布の可視化", ラン藻ゲノム交流会 2018 年 6 月
- [2]. **寺本 高啓**, "軟 X 線イメージングによるシアノバクテリア細胞中の元素分布の可視化", 平成 30 年 立命館大学 SR センター研究成果報告会 2018 年 6 月
- [3]. **寺本 高啓**, "軟 X 線リアルタイム顕微イメージングによる光合成発生酸素の可視化", 光科学談話会 2018 年 3 月
- [4]. **寺本 高啓**, 浅井 智広, 寺内 一姫, 吉村 真史, 太田 俊明, "軟 X 線顕微鏡を用いた糸状性シアノバクテリアにおける光合成発生酸素の直接観察", 第 59 回日本植物生理学会年会 2018 年 3 月
- [5]. **寺本 高啓**, 浅井 智広, 寺内 一姫, 吉村 真史, 太田 俊明, "軟 X 線顕微鏡による生きたシアノバクテリア中の細胞内元素分布の可視化", 第 31 日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム 2018 年 1 月
- [6]. **寺本 高啓**, 浅井 智広, 寺内 一姫, 吉村 真史, 太田 俊明, "Visualization of Intracellular Element Concentration in cyanobacteria with soft x-ray live cell imaging", 第 55 回生物物理学学会年会, 2017 年 9 月
- [7]. **寺本 高啓**, 浅井 智広, 寺内 一姫, 吉村 真史, 太田 俊明, "軟 X 線顕微分光による生きたシアノバクテリア中の細胞内元素分布の可視化", 第 11 回分子科学討論会, 2017 年 9 月
- [8]. **寺本 高啓**, 徳永英司, 岡田美智雄, "Revealing the ultrafast dynamics in CVD Graphene with a few cycle visible pulse laser", 33rd Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics, 2017 年 6 月
- [9]. **寺本 高啓**, 浅井 智広, 寺内 一姫, 吉村 真史, 太田 俊明, 「分子状酸素の直接観察を目指

したシアノバクテリアの単一細胞元素選択的軟 X 線イメージング」, 第 8 回日本光合成学会, 2017 年 5 月

[10]. 寺本 高啓, 浅井 智広, 寺内 一姫, 吉村 真史, 太田 俊明, “Visualization of nitrogen distribution in a filament of cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 by soft X-ray microscopy”, 第 58 回植物生理学会年会, 2017 年 3 月

[11]. 浅井 智広, 寺本 高啓, “透過型軟 X 線顕微鏡によるシアノバクテリアの元素選択的な細胞内構造の観察”, PF 研究会「PF 挿入光源ビームライン BL-19 の戦略的利用に関する研究会」 2017 年 1 月

[12]. Ohoyama Hiroshi, Teramoto Takahiro, “Initial gas dissolution dynamics at the gas-liquid interface studied by using an ionic liquid beam”, Symposium on Surface Science & Nanotechnology, 2017 年 1 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：長澤 裕

ローマ字氏名： Nagasawa, Yutaka

所属研究機関名：立命館大学

部局名：生命科学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50294161

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

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。