

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05759

研究課題名(和文) 孤立分子イオンのレーザー誘起蛍光観測と溶媒効果

研究課題名(英文) Laser-induced fluorescence and solvent effects of gas-phase isolated ions

研究代表者

本間 健二 (HONMA, KENJI)

兵庫県立大学・物質理学研究科・特任教授(名誉教授)

研究者番号：30150288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エレクトロスプレーイオン化(ESI)法で気相に取り出したイオンを真空中、孤立分子イオン状態でレーザー誘起蛍光(LIF)法、分散蛍光(DF)法、によって観測し、電子励起状態の挙動を解明した。紫外光領域の観測に初めて成功し、高い電子励起状態から内部転換によって生成した非常に高い振動励起状態からの発光観測に成功した。本手法は、濃度の低さが問題であったESI法によって真空中に取り出すことのできるイオン種に光吸収・発光分光法を適用する可能性を開くことができた。また、ESIで生成した液滴に赤外線レーザーを照射して加熱する手法を開発し、生体高分子の熱誘起相転移の機構を解明する新しい道を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エレクトロスプレーイオン化(ESI)法で初めて気相に取り出すことのできるイオン種について、光吸収・放出という電子励起状態の挙動解明に最も一般的な手法を適用し、観測領域を紫外光へ初めて拡張した。その結果、高い電子励起状態から内部転換によって生成した非常に高い振動励起状態からの発光観測に初めて成功した。この手法は、生体高分子の溶液中、あるいは生体中で挙動を観測する主な手法である光吸収・放出の観測を気相中でも実現可能にし、直接比較へ道を開いた。また、ESI液滴に赤外線レーザーを照射して加熱する手法は、高分子の熱誘起相転移の機構を解明する新しい道手法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Laser-induced fluorescence and dispersed fluorescence techniques were applied for ions formed by electrospray ionization (ESI) and trapped in collision free condition. Dynamical behavior of electronically excited states of ions could be derived without any perturbation of solvents. Relaxation processes of higher excited states formed by a uv photon were studied for the first time. This research has open a new possibility to study photo-absorption and emission of gas-phase ions which can be prepared only by the ESI technique. An infrared laser was also applied to heat droplets formed by the ESI technique to study heat induced conformation changes of biological molecular ions such as protein ions.

研究分野：物理化学

キーワード：レーザー誘起蛍光 イオントラップ 分散蛍光スペクトル イオン移動度分析 質量分析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エレクトロスプレーイオン化(ESI)法は、生体高分子など加熱に対して不安定な化学種を、気相中に取り出すことのできるソフトなイオン化法として、質量分析計のイオン源として広く用いられている。生体高分子や錯イオンなどは、ESI法によって初めて気相中に取り出すことが可能になり、特にタンパク質などは質量スペクトルやイオン移動度分析によって、構造や機能が詳細に研究されている。また、孤立分子状態にあるイオンの光吸収を、親イオンの解離による減衰として観測する「光解離アクション分光法」によって、赤外～紫外領域の吸収スペクトルが測定されるなど光学分光法による電子励起状態などの情報も得られるようになってきた。

しかし、①ESI法によって気相孤立分子として取り出すことが可能になった生体高分子などは、生体中・溶液中では、光吸収・発光によってその挙動が観測・研究されてきており、溶媒などの影響を受けない孤立分子状態でそれらと比較できる情報を得るためには、気相孤立分子イオンに対する発光分光法や直接吸収分光法が不可欠である。②光解離反応は励起状態の緩和過程の一部であり、光解離アクション分光法で得られるスペクトルは吸収スペクトルを正しく反映していない場合も多く、その観点からも発光を介した分光法を確立することが求められていた。

### 2. 研究の目的

開始当初の目標は以下の諸点であった。

- ① エレクトロスプレー(ESI)ーイオンファネル(IF)ーイオントラップ(IT)ー飛行時間型質量分析計(TOFMS)を組み合わせた装置を開発しそれを用いて、ESI法で初めて気相中に取り出したイオン種のLIF観測を行い、適用できるイオン種を拡張する。これら蛍光マーカを持つ気相生体高分子の挙動を観測する。
- ② 付着溶媒分子数を制御し、孤立分子状態から溶液中のイオンへ段階的に変化していく様子を観測し、分子レベルの溶媒効果を解明する。
- ③ LIFスペクトルと光解離アクションスペクトルの比較、蛍光寿命測定などから、電子励起状態の包括的な描像を得る。

更に、海外の研究者との共同研究を積極的に行い、広くESI法によって気相中に単離された生体高分子の構造(コンフォーメーション)および反応を解明することを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### ① ESI-IT-LIF/TOFMS装置によるイオンのレーザー誘起蛍光/分散蛍光スペクトルの観測

実験装置の概略は下に示すFig.1の通りである。試料イオンを含む溶液をESI needleからエレクトロスプレーして得られる液滴はキャピラリーを通して真空容器内に導く。キャピラリーである程度脱溶媒和した試料イオンは、イオンファネル(IF)を通過する過程で背景ガスと衝突を繰り返して完全に脱溶媒和する。溶媒を失ったイオンはレンズ、八極子イオンガイド(OPIG)によってイオントラップ(IT)に導かれその中に保持される。IT中のイオンに紙面と垂直方向にレーザーを照射する。レーザー光を吸収したイオンからの発光は垂直方向にレンズで集光しフィルターを通し光電子増倍管で観測する。分散蛍光スペクトルは、蛍光を分光器を通してICCD検出器(MC-ICCD detector)で測定する。ITに保持されていたイオンは定期的にIT電極にかけたパルスで飛行時間型質量分析計(ARTOF-MS)へ送られ質量スペクトルを観測する。

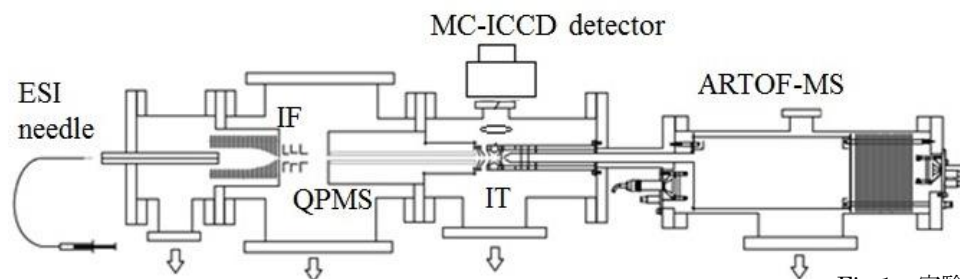


Fig.1 実験装置

レーザーは容易に紫外領域へ波長領域を広げられる波長可変パルスレーザーを用いる。光解離が起こる場合には、解離生成物の増加あるいは親イオンの減少からアクションスペクトルを測定することも可能である。

#### ② タンパク質の温度誘起コンフォーメーション変化の観測

本研究は、インディアナ大学 Clemmer 教授の研究室で共同研究として行った。実験装置は、温度可変エレクトロスプレーイオン源ーイオン移動度分析装置ー飛行時間型質量分析計からなり、水溶液中のタンパク質(ミオグロビン)をESIによって気相に取り出し脱溶媒和の後にイオン移動度分析装置によりその衝突断面積=コンフォーメーションを測定した。そのイオンの質量は引き続き質量分析によって決定された。また、ESIで生成した液滴にCO<sub>2</sub>赤外線レーザーを照射し瞬間的に加熱を行い、定常的な温度上昇との構造変化に与える効果の違いを観測した。

#### 4. 研究成果

##### ① 孤立分子状態にあるイオンのレーザー誘起蛍光(LIF)スペクトル・分散(DF)蛍光スペクトル

###### A. LIF スペクトル

発光の量子収率の高いイオン種として、ローダミン系のレーザー色素イオンを用いて、そのLIF観測を行った結果の一部をFig.2に示す。ローダミン6Gイオンをイオントラップに積算して得られた結果を赤線で、同じ試料のメタノール溶液の蛍光励起スペクトルを青線で示す。孤立分子状態のスペクトルはレーザー光強度に対して1次の依存性を持っており、1光子吸収後の蛍光であることがわかる。また、イオントラップへの蓄積時間に対して直線的に増加するが、7秒程度で強度は飽和し、空間電荷極限のイオンが蓄積されると考えられた。

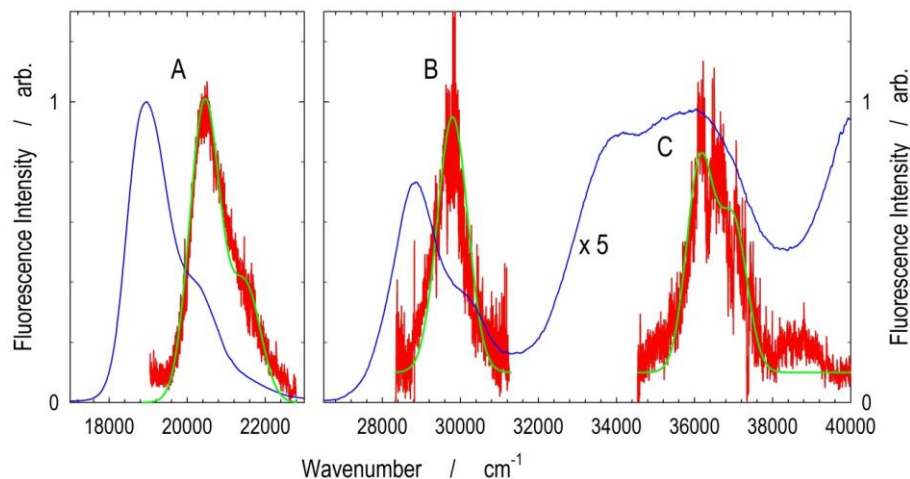


Fig.2 イオントラップに保持されたローダミン6Gイオンのレーザー誘起蛍光スペクトル

Fig.2には可視波長領域のA、紫外領域のB、Cと3つのバンドが示されている。可視領域のスペクトルAはこれまで同様の条件で得られているものとほぼ一致し、 $S_1-S_0$ 遷移と同定された。紫外領域のスペクトルは本研究で初めて観測され

た。理論研究によって $S_2$ 状態は $S_0$ からは禁制であると予測されているので、Bバンドは $S_0$ との間に遷移確率を持つ最も低い励起状態である $S_3$ 状態への $S_3-S_0$ 遷移と同定された。また、Cバンドは更に高い電子励起状態 $S_n$ への吸収であると考えられた。可視・紫外のいずれの吸収帯も溶液中では長波長へシフトしており、極性溶媒により電子励起状態の安定化が基底状態のそれより大きいことによる効果であると考えられた。

###### B. DF スペクトルと励起状態のダイナミクス

可視・紫外の各吸収帯を励起して得られた分散蛍光スペクトルをFig.3(A)に示す。Fig.3(B)には対応する溶液の発光スペクトルを示してある。溶液中では、イオンは溶媒分子と常に衝突をしているため、どの励起状態へ励起しても内部転換(IC)と振動エネルギー緩和(VR)により最低電子励起状態( $S_1$ )の振動基底状態からの発光が観測される。Fig.4(b)に模式的に示すが、 $S_n$ を励起しても $S_1$ を励起してもその発光は青線、黄線で示すように、励起波長によらないスペクトルとなる。

しかし、孤立分子状態イオンではFig.3(A)に示すように、励起波長によってわずかに異なるスペクトルを示すことが明らかになった。光吸収で生成した電子励起状態( $S_3$ ,  $S_n$ )からの発光(紫外領域)は観測されない。励起状態の寿命の間(数ns以下)に、イオンは周囲の分子と衝突が起こらない孤立分子状態にあるので、 $S_n$ または $S_3 \rightarrow S_1$ の内部転換は衝突の助けを借りずに非常に速く起こっていると考えられる。しかし衝突がないため、振動緩和が無視できるため、Fig.4(a)の赤線に示すように $S_1$ の振動励起状態からの発光が観測されていると結論された。振動エネルギーは励起エネルギーを考慮すると $S_1-S_0$ のエネルギー差よりもはるかに大きく、非常に高い振動励起状態からの発光であると考えられ、イオンを孤立分子状態に保持することで初めて観測されたものである。

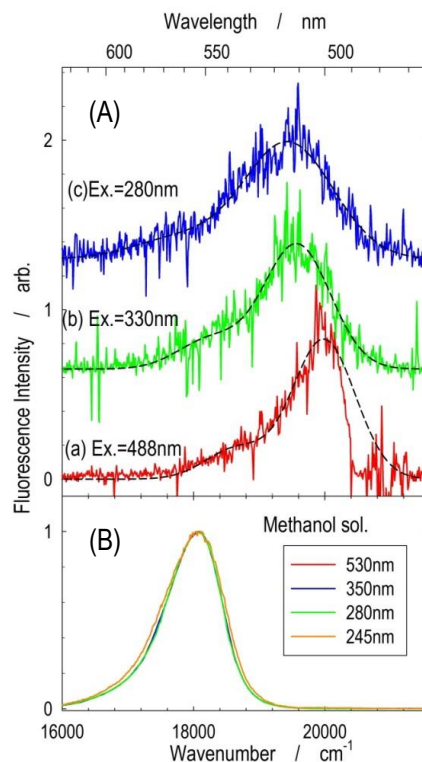


Fig.3 ローダミン6Gイオンの分散蛍光スペクトル(A)イオントラップ中の気相イオン(B)メタノール溶液中

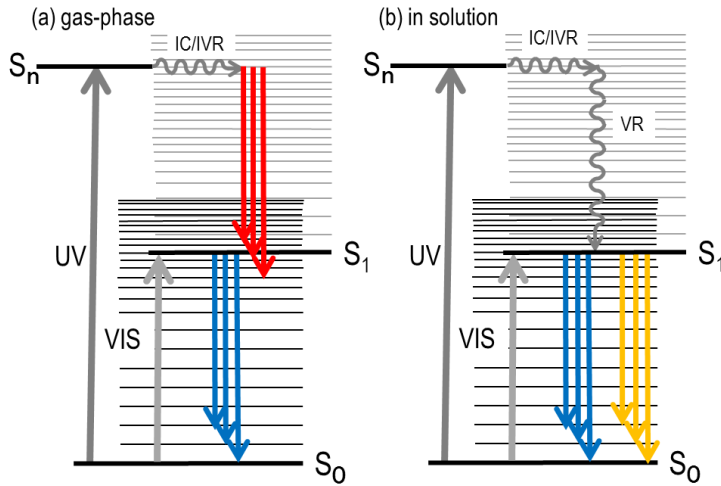


Fig.4 気相及び溶液中の励起状態の発光・緩和過程 (模式図)

② ミオグロビンの温度誘起コンフォーメーション変化

ミオグロビンは分子量 16951Da の水溶性タンパク質で、温度あるいは pH により誘起する「変性」の実態について、溶液中で円二色性(CD)、蛍光性残基の発光などを観測する手法で広く研究されている。本研究では、温度上昇に伴う溶液中の構造変化 (コンフォーメーション変化) を、溶液からエレクトロスプレーによりタンパク質イオンを取出し、その電荷状態を飛行時間型質量分析計で衝突断面積をイオン移動度分析法によって決定して観測した。

A. 溶液の温度上昇に伴うコンフォーメーション変化

ミオグロビンは鉄ポルフィリン (Heme) を配位結合で持っており、温度上昇あるいは pH 低下に伴い Heme が脱離する過程とコンフォーメーションの変化が共に起こることが報告されている。

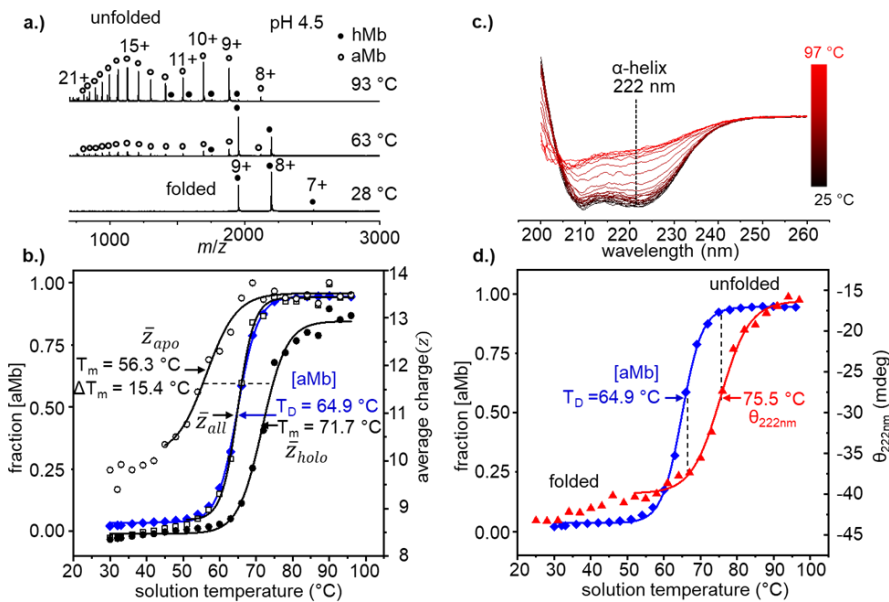


Fig.5 (a)ミオグロビンイオンの質量スペクトル (b)ミオグロビンの温度上昇による遷移曲線 (c)ミオグロビン溶液の CD スペクトル (d)CD による遷移曲線

図中で●で示されている)のみが観測されるが、温度上昇と共に 15+付近をピークとする高い電荷状態のイオンが主になる。同時に、これらのイオンは Heme が脱離したアポミオグロビンイオン(aMb: 図中で○で示されている)である。観測されたイオンの電荷数の平均を溶液の温度に対してプロットすると Fig.5(b)の□のように Sigmoid 型になる。また、aMb の割合を温度に対してプロットすると Fig.5(b)の▲のようにほとんど同様の変化を示し、その変化点=遷移温度として 64.9°C が得られた。溶液中のコンフォーメーション変化を観測するもっとも一般的な 200nm 付近の CD スペクトルを Fig.5(c)に示すが、α-ヘリックスに対応する 222nm の変化を溶液温度に対してプロットすると Fig.5(d)のように

タンパク質のコンフォーメーションは、塩基性残基に付着したプロトンどうしのクーロン反発力により変化するため、イオンの電荷状態と良い相関があることが知られており、観測されたイオンの平均電荷数を観測することができる。

Fig.5(a)に質量スペクトルを示す。室温では 7+ ~ 9+ のミオグロビンイオン (hMb :

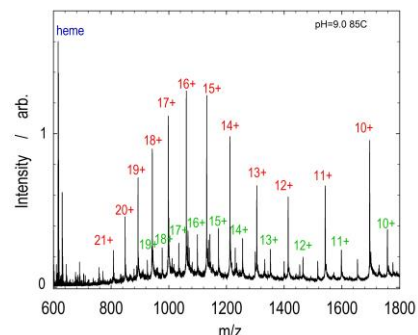


Fig.6 ミオグロビンイオンの質量スペクトル (pH=9.0、85°C)

なり、遷移温度として 75.5°C が得られる。本研究で決定された 64.9°C より高い値になるが、温度上昇と共にミオグロビンに多くのプロトンが付着し高い電荷状態が生成して 3 次構造の変化がまず起こり、より高い温度で  $\alpha$ -ヘリックスなど 2 次構造が失われると考えられる。

本研究で明らかになった興味深い結果の一つは Fig.6 に示すような高い電荷状態の hMb イオンの存在である。電荷数が多いためコンフォーメーションは変化している (unfold) が、依然として Heme を保持している。溶液の pH が中性以上 (6.8 および 9.0) で観測され、Heme が配位しているアミノ酸残基ヒスチジンのプロトン化と関係していると考えられる。

## B. 赤外線レーザーによる液滴加熱によるタンパク質の構造変化

溶液をエレクトロスプレーして生じるタンパク質イオンを含む液滴に CO<sub>2</sub> レーザー (10.6  $\mu\text{m}$ ) を照射して加熱し、液滴中のミオグロビンイオンのコンフォーメーション変化を観測した。

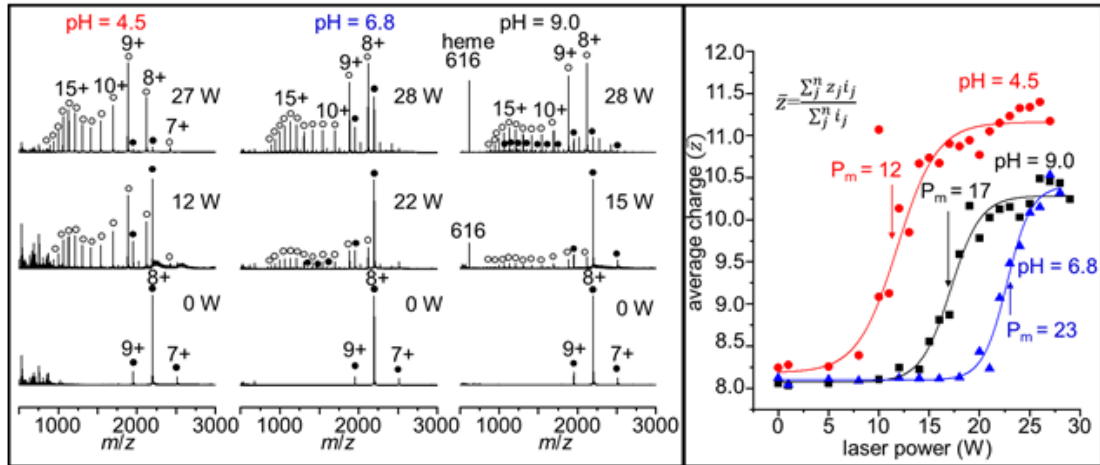


Fig.7 (a)レーザーによる液滴加熱により得られるミオグロビンイオンの質量スペクトル (b)ミオグロビンのレーザー加熱による遷移曲線

Fig.7 にその結果を示す。左側の質量スペクトルを見ると照射するレーザー強度が大きくなるほど、溶液を加熱した場合と同様な変化、つまり Heme の脱離と高い電荷状態の生成が観測される。pH の異なる 3 種類の溶液について測定すると、イオンの平均電荷数はいずれもレーザー強度に対して Sigmoid 型の変化が得られ、あるレーザー強度で構造変化が起こる遷移が起きていることを示している。

エレクトロスプレーチップの先端の大きさを変えると、スプレー中の液滴の初期サイズが変化することが知られている。レーザー照射される液滴のサイズがどのような効果を持つか観測した。Fig.8 には、3 種類のチップサイズを用いた時の平均電荷数をレーザー強度の関数として示した。4~24  $\mu\text{m}$  のいずれのチップを用いてもあるレーザー強度で遷移が観測されたが、遷移に伴う平均電荷数の増加がチップサイズによって異なることが見て取れる。つまり、チップサイズ=液滴サイズが小さいほど、遷移の時の電荷数の上昇が小さい。液滴がレーザー照射されるとバルクの水が赤外光を吸収し、液滴の温度は上昇する。溶液の場合と同様に水中のミオグロビンのコンフォーメーション変化が促されるが、液滴中の水分子の蒸発も促されると考えられる。コンフォーメーション変化は溶媒の無い条件では起こらないことがわかっており、小さな液滴では十分に高い電荷数になる前に溶媒が失われてしまうと考えられる。完全なコンフォーメーション変化を生じる高い電荷状態に到達するタンパク質イオンの割合が小さく、変化の途中の段階で止まってしまった結果が観測されていると考えられる。

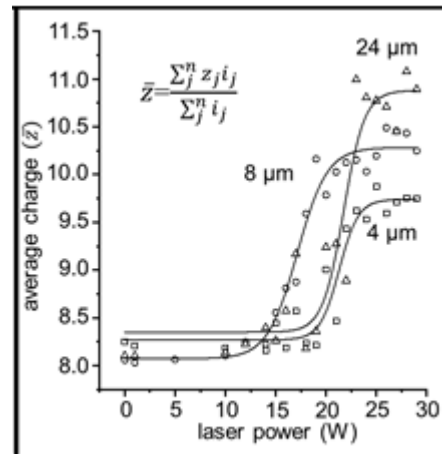


Fig.8 レーザー加熱による遷移曲線。液滴サイズ依存性。

Fig.8 レーザー加熱による遷移曲線。液滴サイズ依存性。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsumoto Yoshiteru, Honma Kenji   | 4. 巻<br>124               |
| 2. 論文標題<br>IR Cavity Ringdown Spectroscopy and Density Functional Theory for Jet-Cooled Pyrrole-Cyclopentanone Binary Clusters: Effect of Pseudorotation on N <sup>2</sup> H <sup>+</sup> ...O <sup>2</sup> C Hydrogen Bonds | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Physical Chemistry A  | 6. 最初と最後の頁<br>2436 ~ 2448 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acs.jpca.0c00794   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Kenji Honma  | 4. 巻<br>20                |
| 2. 論文標題<br>Laser-induced- and dispersed-fluorescence studies of rhodamine 590 and 640 ions formed by electrospray ionization: Observation of fluorescence from highly-excited vibrational levels of S1 states. | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Phys. Chem. Chem. Phys.  | 6. 最初と最後の頁<br>26859-26869 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/C8CP04067B   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsumoto Yoshiteru, Yoshiura Ryuto, Honma Kenji  | 4. 巻<br>147                   |
| 2. 論文標題<br>Identification of crystalline structures in jet-cooled acetylene large clusters studied by two-dimensional correlation infrared spectroscopy | 5. 発行年<br>2017年               |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Chemical Physics   | 6. 最初と最後の頁<br>044302 ~ 044302 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1063/1.4994897   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Honma Kenji, Hirata Daiki  | 4. 巻<br>147                   |
| 2. 論文標題<br>Reaction dynamics of Al + CO <sub>2</sub> AlO + CO studied by a crossed-beam velocity map imaging technique | 5. 発行年<br>2017年               |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Chemical Physics  | 6. 最初と最後の頁<br>013903 ~ 013903 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1063/1.4974943  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                     |

[学会発表] 計9件(うち招待講演 3件/うち国際学会 5件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>本間健二, Dan Woodall, David E. Clemmer |
| 2. 発表標題<br>レーザー照射による液滴中のタンパク質のコンフォーメーション変化     |
| 3. 学会等名<br>第13回分子科学討論会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>HONMA, Kenji Woodall, D. W. Climer, D. E.                  |
| 2. 発表標題<br>Melting proteins in microdroplets induced by laser heating |
| 3. 学会等名<br>35th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (国際学会)    |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>HONMA, Kenji   |
| 2. 発表標題<br>Fluorescence measurement of rhodamine ions under isolated gas-phase condition. |
| 3. 学会等名<br>34th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (国際学会)                        |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>本間健二                               |
| 2. 発表標題<br>真空中に単離した気相イオンのLIF/DF観測: 生体分子観測の可能性 |
| 3. 学会等名<br>第12回分子科学討論会                        |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kenji Honma   |
| 2. 発表標題<br>Observation of Fluorescence from Highly Excited-Vibrational Levels of S1 States of Gas-Phase Rhodamine Cations. |
| 3. 学会等名<br>10th Asian Photochemistry Conference 2018 (招待講演) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>HONMA, Kenji; NAGAOKA, Ayaka; TSURUOKA, Maho; MAKI, Wakaba |
| 2. 発表標題<br>Optical spectroscopy of isolated gas-phase ions            |
| 3. 学会等名<br>33th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (国際学会)    |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>本間健二                 |
| 2. 発表標題<br>真空中に単離したイオンのLIF/DF観測 |
| 3. 学会等名<br>第11回分子科学討論会          |
| 4. 発表年<br>2017年                 |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>本間健二                      |
| 2. 発表標題<br>交差分子線一画像観測法による反応ダイナミクスの解明 |
| 3. 学会等名<br>第11回分子科学討論会 (招待講演)        |
| 4. 発表年<br>2017年                      |



|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kenji Honma  |
| 2. 発表標題<br>Optical spectroscopy of isolated gas-phase ions  |
| 3. 学会等名<br>International Symposium on “ Diversity of Chemical Reaction Dynamics ” ( 招待講演 ) ( 国際学会 ) |
| 4. 発表年<br>2017年   |

〔 図書 〕 計0件

〔 産業財産権 〕

〔 その他 〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  |                           |                       |    |