

令和元年6月7日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18080

研究課題名(和文) 気相共鳴ラマン分光法を用いたミオグロビンヘムの動的構造変化の観測とその理論的解明

研究課題名(英文) Tracking the structural dynamics of myoglobin and its heme structure by gas-phase resonance Raman spectroscopy combined with theory and computation determines

研究代表者

浅見 祐也 (Asami, Hiroya)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：00726078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 巨大生体分子の局所構造を孤立気相状態で観測するため、液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いた気相共鳴ラマン分光装置を開発した。この装置を用いて、ヘムタンパク質の一つであるミオグロビンのヘム構造を反映する気相共鳴ラマンスペクトルを得ることに成功した。観測されたミオグロビンヘムは、ポルフィリン骨格由来の配位に加えてヒスチジンと水分子からの配位がある水溶液中と同様の6配位型構造であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの生体分子の気相分光では、その構造解明に赤外分光法を用いるアプローチが一般的であった。しかしこの手法を膨大な振動自由度を持つ巨大生体分子に適用するのは容易ではない。そこで本研究ではこれに代わる新たな分光法として気相共鳴ラマン分光法を開発した。この手法では、発色団周囲の振動情報のみに着目するため、振動スペクトルの複雑化を回避できる。本研究では、気相中においてもミオグロビンヘムに水分子が配位することを初めて明らかにした。このことは、生体分子と水との関係を一分子レベルで理解できる計測技術になり得る点で、物理化学の枠を超えた幅広い応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)： A novel gas-phase resonance Raman spectroscopy combined with IR-laser ablation of droplet beam was developed in order to observe a local structure of huge biomolecule in the gas phase. By using the developed apparatus, we successfully measured a gas-phase resonance Raman spectrum of heme structure of myoglobin, which is well known as one of heme proteins. The obtained spectrum indicates a six coordination structure, which consists of porphyrin skeletal structure, histidine, and water molecule, is analogous to that in the aqueous solution.

研究分野：物理化学

キーワード：気相分光 共鳴ラマン分光 赤外レーザー蒸発 ミオグロビン ヘム構造 ヘムタンパク質 変性タンパク 液滴

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで独自のレーザー脱離装置を用いた気相分光を精力的に行い、天然に存在する核酸分子に関する中性分子クラスターの構造解析を中心に研究を進めてきた。また最近では、本研究で用いる液滴分子線赤外レーザー蒸発法を利用して、ヘムタンパク質であるミオグロビン(Mb)の紫外吸収に相当する光解離スペクトルの測定に成功した。この光解離スペクトルのピークシフトから、pH 2 付近の溶液中で変性状態にある Mb が気相単離されることで、中性付近での安定構造(天然体)へ大きく構造変化する可能性が示唆された。しかし、現状では振動スペクトルのような構造情報に直結する実験結果が得られていないため、この気相単離時に生じる構造変化の確証を得ることができていなかった。一般的に生体分子の気相分光法では、構造解析手法として赤外分光と量子化学計算との比較を用いるが、タンパク質レベルの巨大分子ではこの方法による明確な構造解析はほぼ不可能である。最近では、この解決策として同位体置換を用いた赤外分光法が注目を集めているが、この方法をタンパク質レベルに拡張することは、時間的にもコストの面でも現実的とは言えない。このことから、タンパク質の気相構造解析を実現するには、新たな方法論の導入が最大の課題となる。

### 2. 研究の目的

生体分子の気相分光はレーザー脱離法や ESI 法の確立に伴い、比較的低分子量の核酸やペプチドについては構造解析手法が確立しつつある。しかし、タンパク質レベルの巨大生体分子の構造解析には未だ有力な手法が無いのが実情である。特に、巨大分子ではその自由度が膨大なため、気相分光の強みである振動分光と理論計算を結びつけた議論が難しいことが最大の問題である。また気化法として既に確立している ESI 法も生体環境で主要なイオンと考えられる低価数のイオンを生成するツールとしては不十分である。当研究室ではこの問題点を解決するため、独自の液滴分子線赤外レーザー蒸発法を開発し、低価数のタンパク質イオンの効率的な生成に成功した。本研究ではこの手法を用いて、低価数のヘムタンパク質を非破壊的に生成し、共鳴ラマン分光法との結合によって、その構造解析を気相中で実現する。このことは、溶媒効果がタンパク質の高次構造にどの程度影響を与えているかを明らかにすることに繋がるため、理論計算との比較によってタンパク質と水分子の関係を解き明かす重要な手がかりになると考えられる。また本研究によって、ヘムタンパク質を対象にした気相での構造解析が実現できれば、他の巨大生体分子の構造解析へ容易に展開できるため、その研究意義、波及効果は共に極めて高い。

### 3. 研究の方法

図 1 に開発した液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いた気相蛍光/ラマン分光装置を示す。10 mM の塩酸中に Mb を 100  $\mu$ M 溶解させた 2 種の試料水溶液(pH 7.0 と 2.1)を作成した。この水溶液を市販の液滴ノズルから 10 Hz でパルス射出し、直径 70  $\mu$ m の液滴を生成した。この液滴をメカニカルブースターポンプ及びターボ分子ポンプで  $2.0 \times 10^{-6}$  Torr 程度に差動排気された真空槽へ導入した。この真空内にはエンドキャップ及びリング電極から成る静電トラップ/加速電極を設置した。2 つのスキマーを介してこの電極部へ誘導された液滴に、水分子の吸収帯である  $3591 \text{ cm}^{-1}$  に波数を合わせた赤外レーザー光を照射した。気相単離された Mb 正イオンは、リング電極部に印加された高周波電圧(pH 7.0: 125 kHz, 1.08 kV<sub>p-p</sub>, pH 2.1: 120 kHz, 1.06 kV<sub>p-p</sub>)によって 70 ms トラップされ、リフレクトロン型の飛行時間型質量分析計により観測した。本研究では、Mb<sup>2+</sup>イオンを価数選択的にトラップし、これに紫外レーザー光(395 nm)を照射して共鳴ラマン散乱光の観測を行った。この共鳴ラマン散乱光はリング電極上部に設置されたレンズ、直角プリズム、コリメータレンズで光ファイバーへと集光し、分光器(リツー応用(株), MC-10N)に導入した。分光器直前にはカットオン波長が 400 nm のロングパスフィルターを設置して、効率的にレイリー散乱光を除去した。得られたスペクトルを解析するため、量子化学計算プログラム Gaussian09 を用いて Mb ヘムの安定構造とその共鳴ラマンスペクトル(395 nm 励起)を B3LYP/cc-pVDZ レベルで見積もった。

### 4. 研究成果

#### <1. 液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いた気相蛍光/ラマン分光装置開発>

図 1 に本研究で新たに開発した液滴分子線赤外レーザー蒸発-気相蛍光/ラマン分光装置を示す。リザーバーに封入した試料溶液は、液滴ノズルから直径 70  $\mu$ m 程度の液滴として 10 Hz で射出される。射出された液滴は、真空チャンバーに空けられたオリフィスと 2 つのスキマーを通過し、イオントラップ/加速電極部まで誘導される。ここに赤外レーザー光 ( $3591 \text{ cm}^{-1}$ , 6 mJ/pulse) を照射することで、液滴内に溶解している試料を気相単離する。生成したイオンはイオントラップ電極部に印加される高周波電圧(RF)の影響で 70 ms 程度トラップされ、加速電極に印加されるパルス電圧によって加速される。加速されたイオンはリフレクトロンで跳ね返り、検出器まで

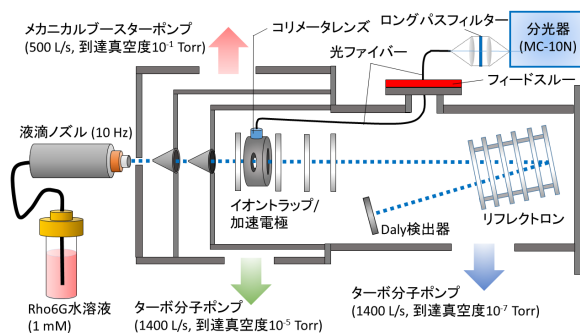


図 1. 本研究で開発された液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いた気相蛍光/ラマン分光装置

誘導される。この時の飛行時間差を利用することで標的イオンの質量スペクトルを得ることができる。

この装置は既存の液滴分子線赤外レーザー蒸発法を利用した質量分析装置のイオントラップ電極部に蛍光を観測するためのレンズや光ファイバーを導入することで構成されている。まず図2に示すように、リング電極の上部にネジ穴(3/8-24UNF)を空け、そこに平凸レンズを収めた。この平凸レンズは、PEEK で自作した中空のネジを用いて、上下から押さえつける形で固定されている。さらに図3に示すように、ワイリーマクラーレン型の4枚板加速電極の上部にPEEK で作成したステージを設け、その上に直角プリズムとコリメータレンズを設置した。このコリメータレンズは光ファイバーと接続が可能であるため、リング電極部で発光が生じると、その光は平凸レンズで集められ、コリメータレンズで効率的に光ファイバーに導入される。この光ファイバーは、新たに設置したフィードスルー(図1)を通して真空チャンバー外へ誘導され、分光器(MC-10N, リューン光学)に導入される。この時、誘導された光は、図1に示すように分光器の直前に設置されたコリメータレンズで一度10 mmのビーム径に拡大され、ロングパスフィルターを通過し、その後再度平凸レンズで分光器のスリットへ絞り込む行程を経る。これによって、蛍光の励起光がリング電極部で乱反射することで生じる迷光をロングパスフィルターで効率的にカットできるため、バックグラウンドを下げ、より高感度に蛍光を観測することができる。本研究では、励起レーザーには10 HzのパルスOPOレーザーを使用しているが、これはCWのレーザー光に比べてワット数が小さいため、観測される蛍光も微弱で且つ寿命が短い。そこで、分光器に導入した検出器はCCDではなく応答速度と感度の高い光電子増倍管(PMT, R13059)を採用した。

## <2. 気相蛍光/ラマン分光装置の性能評価>

完成した気相蛍光/ラマン分光装置を用いて、まずリング電極内で散乱するレイリー散乱光(迷光)を観測し、PMT信号の時間依存性を確認した。励起レーザーの波長は532 nm、強度は0.3 mJ/pulseとし、PMTに印加する電圧を-600 Vとした。(ロングパスフィルターは使用していない。) 図4aに示すように、一般的な分散型の波形が観測され、PMTから正しい信号が出力されていることを確認した。また分光器の波長を変えると532 nmをピークに徐々に出力電圧が減少することも同時に確認されたため、分光・検出部が正しく動作していると考えられる。次に気相中の蛍光信号を観測するため、非常に発光強度が高いことで知られるローダミン6G(Rho6G)を標準試料として用い、液滴ノズルのリザーバーに1 mMのRho6G水溶液をチャージして、計測を行った。この結果、図5aに示す質量スペクトルが得られた。ここでリング電極にRF(500 kHz, 960 V)を印加したところ、図5bに示すようにRho6Gの2価イオンを含むいくつかのイオン種が同時にトラップされた。そこで、これらのイオンからの蛍光信号を観測するため、分光器の波長を548 nmに合わせてオシロスコープでPMTの出力波形を測定した。その結果、図4bに示すようにスペクトルaとは大きく異なる幅広い波形が観測された。このことは、レイリー散乱光とは異なる発光現象を正しく測定できている証拠と考えることができる。またこの波形上に周期的に波打っているノイズが観測されているが、これはリング電極に印加しているRFの生成に利用しているコイルなどから生じる電磁波の影響を受けていると考えている。次にRho6Gの2価イオンを含む気相Rho6Gイオンから生じる蛍光が、バルクの蛍光とどのように異なるのかを調べるため、分光器の波長を掃引して蛍光スペクトルを測定した。図6に示すように、Rho6G水溶液の蛍光は532 nm励起の場合、548、566 nmのいずれのピークでもピークの半値全幅はバルクのものよりもかなり狭い。このことは、バルクでの蛍光分光よりも気相での蛍光分光の方が分

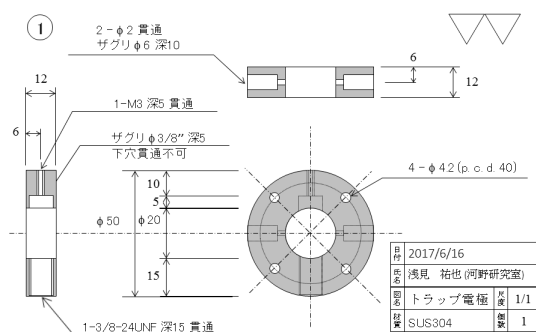


図2. 製作したリング電極の図面

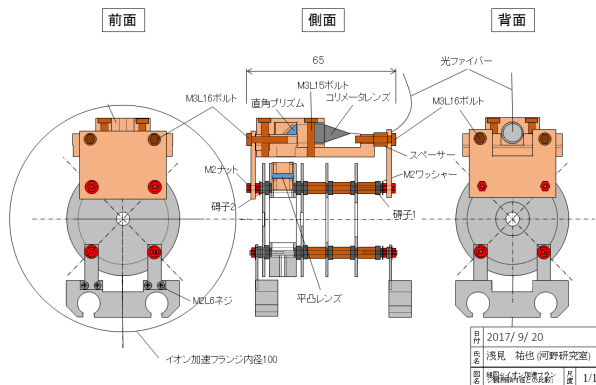


図3. 本研究で設計した加速電極の組立図。加速電極のリング電極部に平凸レンズを収め、上部のステージに直角プリズム、コリメータレンズを設置した。

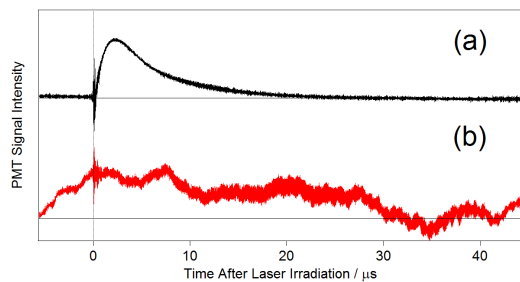


図4. レーザー照射後のPMTの時間応答。(a) レイリー散乱光観測時(分光器波長: 532 nm)。(b) トラップした気相Rho6Gイオンの蛍光観測時(分光器波長: 548 nm)。



子由来の蛍光特性を高分解能で観測できることを示唆している。

上記の気相 Rho6G イオンの蛍光測定が終わった後、実験開始から終了するまでの実験条件の変化を調べるため、液滴ノズルのリザーバー内を超純水に置換し、水液滴を用いて質量スペクトルを測定した。その結果、図 5c に示すように水クラスターの信号の他に、Rho6G 試料に由来すると考えられる非常に強いイオン信号が観測された。これはリング電極部に沈着した Rho6G の汚れが赤外レーザー光でアブレーションし、水液滴の赤外レーザー蒸発時に生成するプロトンと結合することで強く観測されるイオン信号であると考えている。またこのイオンは RF(500 kHz, 1080 V)を印加すると容易にトラップできることも合わせて確かめた。この時、最も低質量側には Rho6G の 1 価イオンが観測されており、条件を整えればこのイオン種のみをトラップすることも可能であると考えている。

### <3. Mb の質量スペクトルとイオントラップ>

図 1 の装置を用いて pH 2.1 と pH 7.0 の 2 種の溶液で得られた質量スペクトル(図 7a,c)を示した。pH 2.1 では Mb の 1 価から 3 価までの親イオンが顕著に観測されるが、pH 7.0 では観測される親イオンの価数は低価数側にシフトし、イオン強度も弱くなる。これは酸性条件ではプロトンイオンが試料溶液中に大量に存在するため、観測されるイオン強度は大きくなり、価数は高い方にシフトすることで説明できる。図 7b,d には、リング電極に高周波電圧を印加して測定した 2 種の質量スペクトルを示した。いずれも Mb の 2 価の領域を選択的にトラップした。pH 7.0 のスペクトル(図 7d)では、Mb の 2 価だけではなく、Mb の 3 価も同時にトラップされ、観測されるピークもややブロードになる。これは、pH 7.0 では気相生成される Mb2 価のイオン量が極めて少ないため、Mb2 価の領域のみを選択的にトラップできる RF 条件が無いためである。

### <4. Mb の気相共鳴ラマンスペクトル(pH 7.0)>

図 8 に pH 7.0 で得られた気相/溶液共鳴ラマンスペクトルを示した。スペクトル a は Mb 水溶液の吸収極大 407 nm に励起波長を合わせて測定した水溶液(pH 7.0)の共鳴ラマンスペクトルである。1378  $\text{cm}^{-1}$  と 1486  $\text{cm}^{-1}$  に 2 種のピークが観測されるが、これは酸化型 Mb ヘムの高スピン状態で顕著に観測されるポルフィリン骨格の  $\text{C}_\alpha\text{-N}$  および  $\text{C}_\alpha\text{-C}_m$  伸縮振動に帰属できる。これらスペクトルの特徴は、通常メト Mb の共鳴ラマンスペクトルの形状とよく一致する。図 8b に励起波長 395 nm で得られた気相共鳴ラマンスペクトルを示した。この励起波長は、気相 Mb イオンの紫外光解離スペクトルで得られるピークの極大に一致している。1364  $\text{cm}^{-1}$  に観測されているピークは、鉄 2 価でみられる  $\text{C}_\alpha\text{-N}$  伸縮振動のピークとよく一致している。このことは、観測されているヘム構造が酸化型ではなく還元型であることを示している。また 1479  $\text{cm}^{-1}$  に溶液でも観測された  $\text{C}_\alpha\text{-N}$  と  $\text{C}_\alpha\text{-C}_m$  の伸縮振動が観測された。また 1648  $\text{cm}^{-1}$  には、 $\text{C}_\beta\text{-C}_\beta$  伸縮振動に相当するピークも明確に観測されている。このことは、水溶液に比べて、気相では得られている振動スペクトルのピークがシャープであること示唆している。得られたスペクトルに観測されている構造を帰属するため、理論計算値との比較を行った。その結果、鉄 2 価で低スピン

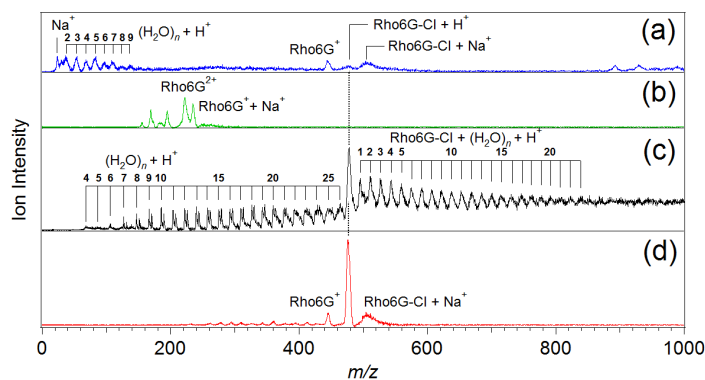


図 5. Rho6G の質量スペクトル. (a) トラップ時間 0 ms, (b) トラップ時間 70 ms, (c) トラップ時間 0 ms(測定試料は超純水), (d) トラップ時間 70 ms(測定試料は超純水).

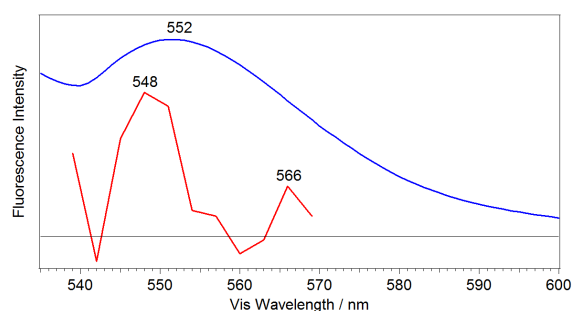


図 6. Rho6G の蛍光スペクトル. 赤は気相イオン状態での測定結果、青は水溶液中で測定したバルク状態での測定結果を示す。

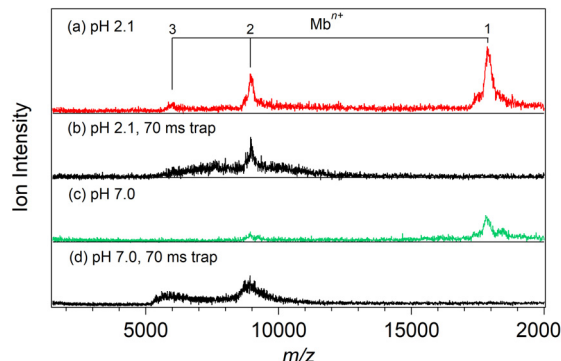


図 7. Mb の質量スペクトル. (a) pH 2.1, イオントラップなし, (b) pH 2.1, イオントラップあり(70 ms), (c) pH 7.0, イオントラップなし, (d) pH 7.0, イオントラップあり(70 ms).

状態( $S=0$ )のヘム構造のスペクトルと非常に良い一致を示した。特に、 $1000\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ の間に計算されるピークは実験値と非常に良い一致を示している。以上の結果は、気相でも水溶液中と同じ6配位型の構造(ポルフィリン骨格、ヒスチジン、水分子から成る配位様式)が実験的に観測されていることを意味している。気相単離の前後でヘム中の鉄原子の価数が減少しているが、これは入射光に用いているナノ秒パルスレーザーによって光還元が生じたためと考えられる。得られた気相共鳴ラマンスペクトルに非共鳴なラマンバンドが観測されていないことを確認するため、励起波長を407 nmに固定した測定した共鳴ラマンスペクトルを図9aに示している。この条件では励起波長が395 nmの場合と比べて、得られるラマンスペクトルの形状が大きく異なる。特に $1600\text{ cm}^{-1}$ よりも高波数側で相対的に信号強度が高くなる。この傾向は非共鳴な条件で計算した振動スペクトルの形状と良く一致している。このことから、励起波長395 nmの条件では、明確な気相共鳴ラマンスペクトルが得られていると結論できる。

#### <5. ミオグロビンの気相共鳴ラマンスペクトル(pH 2.1)>

図10にpH 2.1で得られた共鳴ラマンスペクトルを示す。スペクトルaはMb水溶液の吸収極大359 nmに励起波長を合わせて測定した水溶液(pH 2.1)の共鳴ラマンスペクトルである。スペクトルaでは、 $C_{\alpha}\text{-}C_m$ に帰属できる $1456\text{ cm}^{-1}$ のピークおよび、 $C_{\beta}\text{-}C_{\beta}$ 伸縮振動に帰属される $1629\text{ cm}^{-1}$ が相対的に大きな強度でブロードに観測された。一方、図8aで比較的強い強度で観測されていた $1378\text{ cm}^{-1}$ のピークは相対的に弱い。このスペクトルの特徴は、励起波長が360 nm付近で得られるスペクトルの形状とよく一致する。この酸性条件では、光還元された4配位型のヘム構造が生成することが従来より知られているが、得られたスペクトルの形状が極めてブロードであるため、明確な構造の帰属は困難である。しかし、このブロードなスペクトルの特徴は、タンパク質中のヘム構造の位置が固定されていないフレキシブルな構造になっていることを意味していると考えられ、配位がポルフィリン骨格のみの4配位型構造を示唆するものである。一方、図10bに示した気相の共鳴ラマンスペクトルでは、pH 7.0の気相スペクトルとは異なり、 $1676\text{ cm}^{-1}$ 付近で強いピークが観測されている。また観測されたスペクトルはpH 7.0のものに比べてブロードな形状となっている。構造の帰属を行うため、振動計算を行った結果を図10cに示す。その結果、鉄2価の高スピン状態( $S=2$ )で得られたスペクトルの形は、気相共鳴ラマンスペクトルと非常に良く一致している。このことは、気相中で観測されている構造が、5配位型の構造であることを示している。pH 2.1の水溶液中でのヘム構造は4配位型と帰属されているが、本結果は、このヘム構造が気相単離されることにより、鉄原子とヒスチジンのイミダゾール基との間に配位結合が形成されることを示している。このことは、変性構造であったMbが、気相単離によって、天然体に近いフォールディングな構造を回復することを意味している。

#### <6. 成果の国内外における位置づけとインパクト>

本研究は、従来かけ離れていると思われていた巨大生体分子の構造解析と気相振動分光を結びつける先駆けと位置づけられる。本研究により、タンパク質が気相中でどのような安定構造を形成するのかが明らかになれば、これまでの溶液中での構造解析の結果と比較することで、タンパク質の構造に与える溶媒効果の本質を明らかにできる。これは従来より注目されてきた「生体分子と水」との関係性を明らかにする有力な結果に繋がると期待される。特に本研究では、気相中のMbヘムに水分子が配位していることを明らかにしたが、このことはヘム構造へ溶媒である水分子が強く関与していることを示唆する結果である。この点は現状の生体分子の気相分光分野に止まらず、溶液や結晶を利用したタンパク質の構造に関する研究に有益な情報を与えていると考えられる。また今後、Mbの酸素クラスターへ系を拡張していくことで、Mb

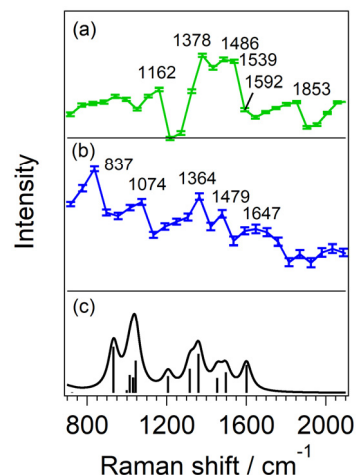


図8. Mbの共鳴ラマンスペクトル。(a) 水溶液(pH 7.0), (b) 気相, (c) 理論計算(B3LYP/cc-pVDZ level)。

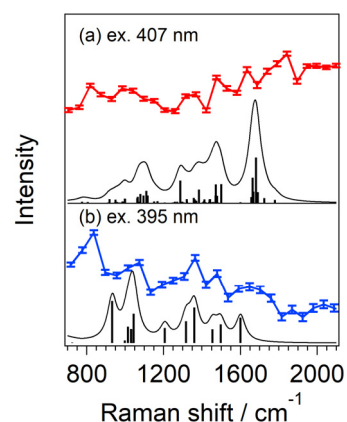


図9. Mbの気相共鳴ラマンスペクトルと理論計算。(a) 励起波長407 nm, (b) 励起波長395 nm. 黒のスペクトルはいずれも理論計算値(B3LYP/cc-pVDZ level)。

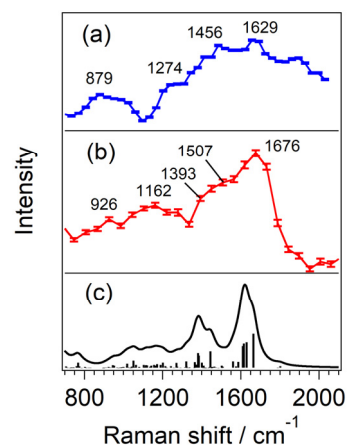


図10. Mbの共鳴ラマンスペクトル。(a) 水溶液(pH 2.1), (b) 気相, (c) 理論計算(B3LYP/cc-pVDZ level)。

が生体中で酸素の貯蔵を担う本質的な理由や、構造的な優位性を解明できる可能性がある。このことは、本研究が物理化学の枠を超えて、生化学や生物分野へ新たな知見を与えることを意味しており、その波及効果は極めて大きい。

#### <6. 今後の展望>

本研究では、気相中でヘムタンパク質の共鳴ラマンスペクトルを測定することと、気相中で生じる動的な構造変化を明らかにすることを目標としてきた。前者に関しては十分な成果を上げることができたと考えられるが、後者に関しては十分な成果を上げることができなかった。この最大の原因は、本研究で用いた分光器の分解能が悪く(30  $\text{cm}^{-1}$ 程度)、得られる振動スペクトルがブロードになってしまったことである。そのため、イオントラップ中で生じる微細な構造変化を十分に捉えるに至らなかった。そこで今後の研究では、より分解能の高い分光器の導入と、幅広い波長領域の共鳴ラマン散乱光を一度に観測できる CCD 検出器の導入を同時に進める予定である。これにより、巨大生体分子が気相単離の過程でどのような構造変化を起こすのかを追跡できるため、「生体分子と水」との関係性をより詳細に議論できると期待している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Photodissociation spectroscopy of protonated guanosine monophosphate based on IR-laser ablation of droplet beam and quadrupole ion trap mass spectrometry  
Hiroya Asami, Norishi Kawauchi, Jun-ya Kohno  
Chemical Physics Letters 720 119-123 2019 年  
DOI: 10.1016/j.cplett.2019.02.007
2. Photodissociation spectroscopy of hydrated myoglobin ions isolated by IR-laser ablation of a droplet beam: Recovery from pH-denatured structure by gas-phase isolation  
Hiroya Asami, Rina Kawabata, Norishi Kawauchi, Jun-ya Kohno  
Chemistry Letters 48(2) 140-143 2019 年  
DOI: 10.1246/cl.180884

[学会発表] (計 9 件)

(うち招待講演 1 件/うち国際学会 4 件)

1. Hiroya Asami, Norishi Kawauchi, Rina Kawabata, Jun-ya Kohno, Local structure analysis of heme protein by resonance Raman spectroscopy in the gas phase, 日本化学会第 99 春季年会(2019), 甲南大学, 3 月 2019 年, 2A3-32. (国内口頭)
2. 浅見祐也, 河野淳也, 巨大生体分子の精密構造解析を目指した次世代の気相分光, 基礎物性シンポジウム, 3 月 2019 年. (国内口頭)
3. 浅見祐也, 河内宜志, 河端里奈, 河野淳也, 液滴分子線赤外レーザー蒸発法を利用したヘムタンパク質の気相共鳴ラマン分光, 第 12 回分子科学討論会, 福岡国際会議場, 9 月 2018 年, 4A01. (国内口頭)
4. 浅見祐也, 高橋佳奈子, 戸村太亮, 河野淳也, 気液界面に吸着する蛍光核酸にみられる分子構造変化, 第 12 回分子科学討論会, 福岡国際会議場, 9 月 2018 年, 3P067. (国内ポスター)
5. Hiroya Asami, Kanako Takahashi, Taisuke Tomura, Jun-ya Kohno, Novel millisecond time resolved spectroscopy for fluorescent nucleic acids: observation of molecular structural change on the droplet interface, Fluorescent Biomolecules and Their Building Blocks - Design and Applications (FB3), Univ. Glasgow, June 2018. (国際口頭)
6. Hiroya Asami, Rina Kawabata, Norishi Kawauchi, Jun-ya Kohno, Protein denaturation observed by gas-phase spectroscopy using IR-laser ablation of droplet beam, IBB18 - Conference on Isolated Biomolecules and Biomolecular Interactions, Texel Netherland, April 2018, No. 26. (国際ポスター)
7. Hiroya Asami, Gas-phase spectroscopy by using IR ablation of droplet beam: High-sensitivity high-resolution observation of protein denaturation, Asian International Symposium, Japan Univ. (Chiba), March 2018. (Invited)
8. Hiroya Asami, Tomoko Hasegawa, Jun-ya Kohno, Chemical denaturation of bovine serum albumin observed by DUV photoelectron yield spectroscopy combined with IR-laser ablation of droplet beam, The Great Scientific Exchange, Nevada USA, October 2017, 17PMA09. (国際口頭)
9. 浅見祐也, 長谷川朋子, 河野淳也, 液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いた変性アルブミンイオンの気相分光, 第 11 回分子科学討論会, 東北大学, 9 月 2017 年, 2A20. (国内口頭)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究分担者

特になし

※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。