

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05559

研究課題名(和文) 超臨界水状態での真空紫外円二色性計測によるタンパク質等の分子構造解析手法の確立

研究課題名(英文) Development of a method for molecular structure analysis of proteins and other chiral molecules by vacuum ultraviolet circular dichroism measurement in supercritical water conditions

研究代表者

田中 真人 (Tanaka, Masahito)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・研究グループ長

研究者番号：30386643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では超臨界水条件などの高圧・高温条件(圧力22.1 MPa以上、温度374℃以上)での円二色性計測に必要な要素技術の開発と評価を目的とした。まず高圧・高温条件での光学セルシステムとして、光学窓としてYAGセラミクス窓を採用したものを開発した。本セルにて圧力として40MPa以上、最大温度400℃までの超臨界水条件を超えた昇圧・昇温試験に成功した。また短時間で円二色性スペクトルが計測可能な分光システムを開発した。開発したセル等を用いて、標準的試料の円二色性スペクトル測定を行い、S体とR体で逆符号の円二色性ピークを確認するなど、本システムにおいて円二色性の測定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本システムにおいて超臨界状態等の高温・高圧条件での分子構造変化の時間変化の測定が可能になる。近年、100℃を超えても活性を失わない超耐熱性タンパク質の発見や、高圧・高温水を用いたタンパク質の加水分解によるペプチドやアミノ酸の低コスト作製方法などが報告されており、本システムによって高圧・高温条件において、タンパク質等のキラルな分子・高分子の構造変化や反応を詳細に調査することができる。また他にも薬品等の滴下からの時間変化(ストップフロー測定)などにも応用できる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to develop and evaluate the technologies required for circular dichroism measurement under high-pressure and high-temperature conditions (pressure above 22.1 MPa and temperature above 374 °C) such as supercritical water conditions. First, an optical cell system for high-pressure and high-temperature conditions was developed by using a YAG ceramic window as an optical window. The cell was successfully tested at pressures of 40 MPa or higher and temperatures up to 400 °C, exceeding the supercritical water conditions. We have also developed a spectroscopic system that can measure circular dichroism spectra in a relatively short time. Using the developed cell and others, we measured the circular dichroism spectra of standard samples and observed circular dichroism peaks with opposite signs for S- and R-isomers, and successfully measured circular dichroism with this system.

研究分野：分光分析、量子ビーム利用、キラル科学

キーワード：分子構造 円二色性 キラリティ 光吸収 分光計測

1. 研究開始当初の背景

円二色性(Circular Dichroism: CD)は、左円偏光と右円偏光での光吸収の差分であり、この円二色性スペクトルの測定はタンパク質やアミノ酸などのキラリティをもつ分子・高分子の分子構造解析や医薬品等のキララ純度の決定などに広く用いられており、紫外線から赤外線では広く装置が市販されている。例えばタンパク質の二次構造(ヘリックス、シート、ターンなど)で円二色性スペクトルが異なることを利用し、測定したスペクトルと既知のスペクトルデータベースを用いることで、タンパク質の二次構造の含有率の解析等が行われている。

円二色性の大きな特徴として、結晶構造解析等と比較して、温度、pH、薬品添加などにおける測定対象の分子構造・高次構造の変化を比較的容易に追跡できる点が挙げられる。温度変化に関しては、その変化範囲は水溶媒では通常最大 100 に限定される。近年、100 を超えても活性を失わない超耐熱性タンパク質の発見や、高圧・高温水を用いたタンパク質の加水分解によるペプチドやアミノ酸の低コスト作製方法などの研究開発が報告されている。しかし高圧・高温条件において、タンパク質等のキララな分子・高分子のどのような構造変化や反応が起きているかは調べられておらず、特に高圧・高温な超臨界水中での円二色性測定の報告例は提案者の知る限り無い。

2. 研究の目的

上記より、本研究では超臨界水条件などの高圧・高温条件(圧力 22.1 MPa 以上、温度 374 以上)での円二色性計測を実現するために必要な要素技術として、高圧・高温条件での溶液用の光学セルシステムの開発、ならびに比較的短時間で円二色性スペクトルを計測可能な分光計測システムの開発、ならびに各開発技術の評価を目的とした。

3. 研究の方法

高圧・高温条件での溶液用の光学セルシステムの設計と開発をまず行った。セルの本体材料やフランジなどの主な部品の材料として、耐熱合金であるハステロイ合金を採用した。またフランジなどの部品間の締結方法として、耐圧性の高い金属製 O シールを用いたものを選択した。光学測定に重要な光学窓の材料として、YAG(イットリウムアルミニウムガーネット)セラミックスを採用し、直径 2 mm 程度の光に対する開口部を設けた。高圧セル等で一般的に用いられる光学窓の材料は、主に耐圧性や透過性の高さからサファイアを用いることが多い。しかしサファイアは異方性結晶のため、直線複屈折という垂直・水平直線偏光での屈折率が異なるという光学特性を持つ。円偏光の左右に対する吸収率の差である円二色性とは一見無関係に思えるが、直線複屈折のような直線偏光に対する異方性が、円二色性のような円偏光に対する異方性の測定に影響を与え、更に一般的に直線偏光に対する異方性の方が円偏光に対する異方性よりも非常に大きいため、多くの場合で正確な測定を阻害する要因になる。このため円二色性計測用の光学セルの窓材には、サファイアのような直線異方性を有する材料は適さない。そこで耐圧性、透過性ともにサファイアに匹敵し、かつ透明セラミックスのため異方性を有しない YAG セラミックスを光学窓に選定した。

円二色性スペクトルを計測可能な分光計測システムとして、圧力・温度変化中などの構造変化を観測できるようにするために比較的短時間で測定可能なものの開発を目指した。一般的に円二色性計測においては、円偏光の左右を光弾性変調子と呼ばれる光学機器で高速で切り替え、切り替え周波数と同じ信号成分をロックインアンプなどで検出する。光弾性変調子の動作パラメータは光の波長によって異なるため、分光器等で単一の波長にしてから、波長ごとに円二色性強度を計測して、スペクトルを得ている。そのため条件にもよるが 10 分以上は測定時間がかかる。そこで光弾性変調子やロックインアンプなどを用いず、高感度なマルチチャンネル分光器等を用いて、円二色性スペクトルを計測可能な分光計測システムを構築した。

4. 研究成果

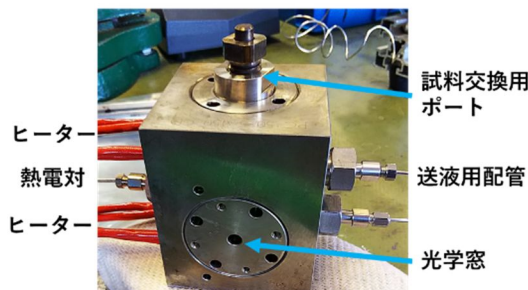
図 1 (a)に開発した高圧・高温条件に対応可能な溶液用光学セルの外観を示す。ヒーターにより加熱と熱電対による中心部の温度計測を行い、ヒーター電源の ON/OFF により温度の制御を行う。また外部の高圧ポンプを用いることで加圧を行うことができる。また本光学セルの光路長は、部品を変更することで、最短 2 mm、最長 10 mm、他に約 3 mm と 4 mm を選択でき、試料の種類や濃度に応じて適切な光路長を選択できる。

本光学セルの耐圧・温度制御試験を行った結果、圧力として 40 MPa 以上、最大温度 400 までの昇圧・昇温に同時に成功した。本セルは超臨界水条件である圧力 22.1MPa 以上、温度 374 以上の耐圧性、耐高温性を有していることが明らかになった。

図 1 (b)に開発した円二色性スペクトルを計測可能な分光計測システムの外観を示す。光源としてレーザー駆動のキセノンランプを用いた。このランプからの光をアルミコートされた非軸放物面鏡を準平行光にした後、深紫外領域まで透過できる直線偏光プリズムで 45° の直線偏光

にし、更に広帯域の1/4波長板(対応波長200~400nm)により円偏光にした。直線偏光プリズムならびに広帯域1/4波長板は面内回転ステージに設置されており、特に広帯域1/4波長板の面内角度を0°から90°毎に変えながら測定することで、円偏光の左右の切り替えを行った。またアパーチャーで不要な光を除去し、試料セルを透過させた後に、集光レンズで光ファイバーに集光し、最終的には高感度なマルチチャンネル分光器で透過光強度スペクトルを計測した。試料濃度やセルにもよるが、一回の強度スペクトル計測における露光時間は数十ミリ秒~200ミリ秒程度であった。

(a) 光学セルの外観



(b) 測定システムの外観

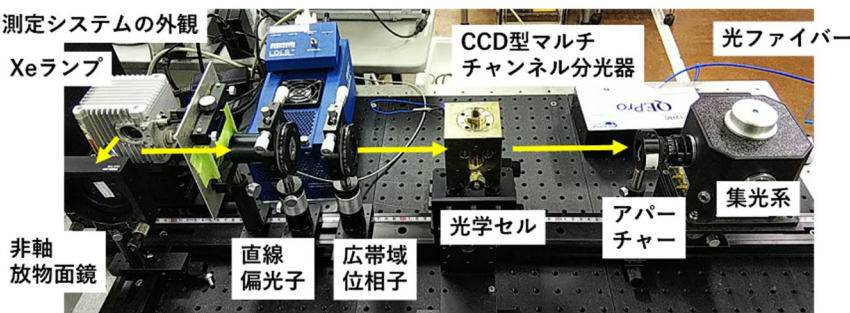


図1 (a) 開発した高圧・高温条件に対応可能な溶液用光学セルの外観
(b) 開発した円二色性スペクトルを計測可能な分光計測システムの外観

システムの評価のために、円二色性の標準的な試料であるカンファスルホン酸アンモニウムに関して、それぞれ逆の円二色性を示すエナンチオマーであるR体とS体の水溶液を調製した。濃度に関しては、R体は約1%、S体は約0.6%とした。カンファスルホン酸アンモニウムは波長290nm付近に、R体はマイナス、S体はプラスの円二色性ピークが観測されることが知られている。

まず一般的なセル長10mmの石英製光学セルを用いて、本システムの評価を行った。広帯域1/4波長板の面内角度が、0°、90°、180°、270°での光吸収スペクトルを計測した。円二色性信号は、例えば面内角度0°と90°の場合の光吸収強度の差分から得ることができる。ここでR-カンファスルホン酸アンモニウム水溶液の円二色性スペクトルの、面内角度0°と90°の場合、面内角度180°と270°の場合、およびその平均の結果を図2(a)に示す。ここでそれぞれのスペクトルは3回測定を行い、その平均を取った。面内角度0°と90°の場合と面内角度180°と270°の場合とで、スペクトルの形状はほぼ同じだが、円二色性のベースライン(強度ゼロ付近)の信号が異なることがわかる。これは光学系の不完全性(直線偏光子や広帯域1/4波長板の角度のずれなど)に由来するものと思われる。広帯域1/4波長板の面内角度を単に0°と90°だけで測定するだけでなく、測定角度条件を増やすことでベースラインを減らせることが分かる。以下の測定は同様の角度、積算条件で測定を行った。

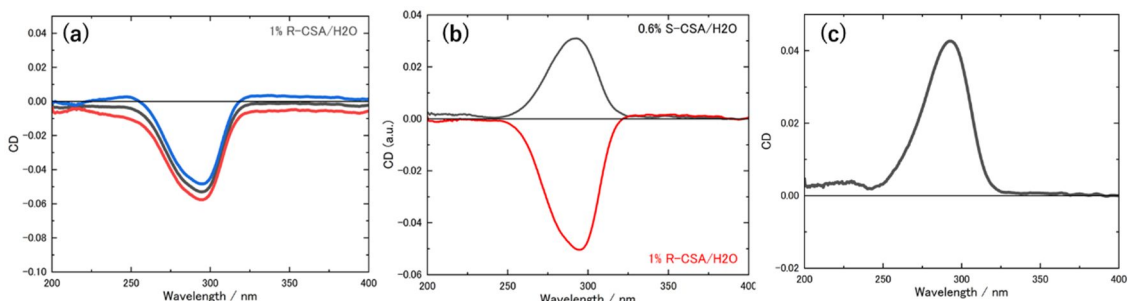


図2 (a) R-カンファスルホン酸アンモニウム水溶液の円二色性スペクトル； 赤線：面内角度0°と90°の場合、青線：面内角度180°と270°の場合、黒線：その平均、(b)測定した0.6% S-カンファスルホン酸アンモニウム水溶液(黒線) 1% R-カンファスルホン酸アンモニウム水溶液(赤線)の円二色性スペクトルの結果、(c)開発した光学セル(セル長10mm)での0.6% S-カンファスルホン酸アンモニウム水溶液の円二色性スペクトル

広帯域 1/4 波長板の面内角度条件を 0° 、 90° 、 180° 、 270° で計測した 0.6% S-カンファスルホン酸アンモニウム水溶液と、1% R-カンファスルホン酸アンモニウム水溶液の円二色性スペクトルの結果を図 2(b)に示す。なおここではスペクトルの長波長付近の信号をゼロにするように補正を行っている。また濃度による規格化は行っていない。このように S 体と R 体とで、ピーク波長 (約 290 nm) は同じで、強度が反対の円二色性スペクトルを測定することに成功した。

更に同じ測定条件で、開発した溶液用光学セルで 0.6% S-カンファスルホン酸アンモニウム水溶液の円二色性スペクトルを室温・1 気圧条件で測定し、ほぼ同じ円二色性スペクトルが測定できることを確認した (図 2(c)) した。

今回の測定でトータルの露光時間は積算 1 回辺り 1 秒以下であり、面内角度の移動や測定プログラムの自動化を行うことで、非常に短時間で円二色性スペクトル測定を行えることが分かった。以上より、本研究の目的を適切に達成したと結論した。

将来的には光学系の改良等による測定システムの高度化等も含めて、本システムにおいて超臨界状態などの高温・高圧条件での分子構造変化の時間変化の測定が可能になるだけでなく、薬品等の滴下からの時間変化 (ストップフロー測定) などにも応用できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 真人、小川 博嗣、佐藤 大輔、澁谷 達則、黒田 隆之助
2. 発表標題 偏光分光・イメージングを用いた分析技術の開発
3. 学会等名 2022年度計量標準総合センター成果発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 真人、池浦 広美、大島 永康、大平 俊行、小川 博嗣、ORourke Eugene Brian、加藤 英俊、木野 幸一、木村 大海、黒田 隆之助、佐藤 大輔、澁谷 達則、鈴木 良一、清 紀弘、藤原 健、三浦 永祐、満汐 孝治、安本 正人、山脇 正人、堀 利彦、友田 陽、室賀 岳海、古坂 道弘、林崎 規託
2. 発表標題 産総研つくばセンター電子加速器施設の現状
3. 学会等名 第36回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 真人
2. 発表標題 アストロバイオロジーとキラル分光計測技術
3. 学会等名 計算アストロバイオロジー2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 真人、池浦 広美、大島 永康、大平 俊行、小川 博嗣、ORourke Eugene Brian、加藤 英俊、木野 幸一、黒田 隆之助、佐藤 大輔、澁谷 達則、鈴木 良一、清 紀弘、藤原 健、三浦 永祐、満汐 孝治、安本 正人、山脇 正人、渡津 章、穴戸 玉緒、友田 陽、室賀 岳海、古坂 道弘、堀 利彦、林崎 規託
2. 発表標題 産総研つくばセンター電子加速器施設の現状
3. 学会等名 第35回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 真人、小川 博嗣、佐藤 大輔、澁谷 達則、黒田 隆之助
2. 発表標題 偏光を利用した分光分析・イメージング技術の開発
3. 学会等名 2021年度計量標準総合センター成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 真人、池浦 広美、大島 永康、大平 俊行、小川 博嗣、ORourke Eugene Brian、加藤 英俊、木野 幸一、黒田 隆之助、佐藤 大輔、鈴木 良一、清 紀弘、藤原 健、三浦 永祐、満 汐 孝治、安本 正人、渡津 章、友田 陽、宍戸 玉緒、室賀 岳海、古坂 道弘、堀 利彦、林崎 規託
2. 発表標題 産総研つくばセンター電子加速器施設の現状
3. 学会等名 第34回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 真人、佐藤 大輔、黒田 隆之助
2. 発表標題 円二色性分光とテラヘルツ利用研究
3. 学会等名 第2回テラヘルツ・バイオ 研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Masahito Tanakaの研究紹介
<https://staff.aist.go.jp/masahito-tanaka/>

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------