

生体分子システムの揺らぎ解析のための 二次元蛍光相関分光法の開発

石井邦彦, 田原太平

理研・田原分子分光

我々は生体分子システムの機能に関わる揺らぎを分光学的アプローチに基づいて解明することを目指している。酵素反応やフォールディングなど、複数の準安定構造の間の揺らぎが生体機能の理解のために重要であるケースは数多い。これらの現象に対して、多数分子の平均測定から揺らぎを議論することは難しい。その代わり、揺らぎを一分子レベルでリアルタイム追跡し、その時間変化の一般的な特徴を抽出した上で、分子固有の性質として記述することが求められている。このためには、一分子の分光シグナルをできる限り幅広い時間スケールで詳細に計測するための手段が必要になる。実際現在までに、溶液中の単一自由分子に対して数十マイクロ秒から数秒の時間スケールで蛍光強度の揺らぎを測定する方法が報告されている[1,2]。

我々はさらなる時間分解能の向上を目指すため、蛍光相関分光法（FCS）に着目し、FCSの原理を応用した新しい測定・解析技術の開発を試みている。FCSでは分光シグナルの時間変化 $I(T)$ に含まれる情報のうち2点相関関数 $C(\Delta T) = \langle I(T)I(T+\Delta T) \rangle$ のみを扱う。この量は統計平均であり、分子一つ一つのシグナルを厳密に区別して追跡することを要求しない。このため、溶液中の試料分子の濃度を極端に低く抑える必要がない（もちろん揺らぎが測定系のノイズに埋もれてしまわない程度には低濃度でなくてはならない）。このことからFCSは、分子の少数性を利用して揺らぎを直接計測する分光法でありながら、ナノ秒領域までの高い時間分解能を比較的容易に達成できる。ただし実際には、 $C(\Delta T)$ の値のみを用いて系の不均一性の詳細を描出することは難しい。我々の基本戦略は、FCSにおける蛍光強度 $I(T)$ を付加的な分光パラメータ x を用いて $I(T; x_1)$, $I(T; x_2)$, ...のように分類し、得られる情報の量を増やすことで、FCSの分子種識別能力を大幅に向上させることである[3]。

生体分子の構造変化をFCSや単一分子分光法で観測する場合、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法が用いられることが多い。ところがFCSでは基本的に2つの光子から分子の状態変化を判定するため、FRETによる計測法を直接応用することは難しい。通常のFRET計測ではドナー色素とアクセプター色素の間の励起エネルギー移動を各色素固有の波長で測定した蛍光強度（=検出光子数）の比から求めるので、分解能を確保するために多くの検出光子数が必要になるからである。蛍光相関分光法ではひとつの光子からその時点での分子の状態について何らかの情報が得られなければならない（信号積算による改善が見込めるので、精度は粗くてもよい）。我々はFRETのエネルギー移動効率をドナー蛍光・アクセプター蛍光の強度比からではなく、ドナー蛍光の蛍光寿命から求めることでこの問題を回避できると考えた[4,5]。パルスレーザーを使って蛍光色素を周期的に励起し、蛍光光子の放出遅延時間を励起パルス基準として正確に測定すれば、各光子に蛍光寿命の情報を付加することができる（図1）。放出時間が速い光

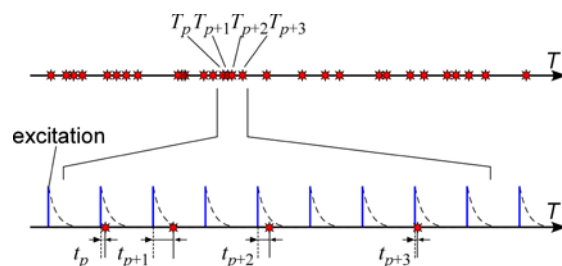


図1 蛍光寿命の情報を付加した光子データ。T, tはそれぞれ実験開始からの経過時間と励起パルスからの遅延時間。

子は FRET 効率の高い分子に由来する確率が高く、遅い光子はその逆になると予想される。このことを利用して分子の状態変化を蛍光寿命の変化として観測するのである。

このような発想に基づいて得られた光子データを体系的に整理して可視化するため、我々は二次元蛍光相関分光法を提案した[6]。これはある一定の時間間隔をもって放出された光子の対を集め、各光子対の一つ目・二つ目の光子の励起—発光遅延時間をそれぞれ横軸・縦軸に取って二次元ヒストグラムを作成するものである。この二次元マップから無相関成分（別々の分子から放出された光子の対に相当する）を適切に引き去ると、一分子 FRET 実験によるものと等価な情報を与える二次元相関マップが得られる。さらに各軸を逆ラプラス変換して発光遅延時間から蛍光寿命へ変換することで、FRET のエネルギー移動効率が異なる状態間の交換がどのような時間スケールで起こっているかを可視化することができる。図 2 は蛍光寿命 τ が異なる 2 つの状態（ $\tau = 1$ ns, 5 ns）を仮定して人工的に発生させた光子データを解析した例である。逆ラプラス変換には最大エントロピー法を用いた。光子対の間隔 ΔT を 2 つの状態間の交換反応の時間スケール（50 μ s）より短く設定した場合（a, $\Delta T = 0 - 10$ μ s）、2 つの状態を表す対角ピークのみが観測されるが、 ΔT を長くすると（b, $\Delta T = 200 - 220$ μ s）、それらの間の交差ピークが現れる。この交差ピークの ΔT 依存性を調べることで 2 状態の平衡化過程を追跡することができる。

現在我々はこの手法を応用して、ヘアピン型一本鎖 DNA の塩基対生成反応など生体高分子の構造揺らぎが重要な役割を果たすプロセスをマイクロ秒の時間分解能で調べる研究を進めており、従来の方法では見えなかった高速時間領域での揺らぎの詳細が明らかにされつつある。さらに、レーザー照射点の多焦点化により信号収集効率を高めた新たな装置等、測定手法のさらなる高度化に向けた開発研究が進行中である。本手法を基盤としてタンパク質・DNA・RNA 等の構造揺らぎの特徴をつかみ、機能の発現において重要な生体分子システムのダイナミクスの本質を理解し、分子の科学として記述することが最終的な目標である。

【参考文献】

- [1] Hoffmann A. et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 1857.
- [2] Kamagata K. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11525.
- [3] 石井邦彦・田原太平, 生物物理, **2012**, *52*(6), 295.
- [4] Ishii, K.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 12383.
- [5] Ishii, K.; Tahara, T. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, 519-520, 130.
- [6] Ishii, K.; Tahara, T. manuscript in preparation.

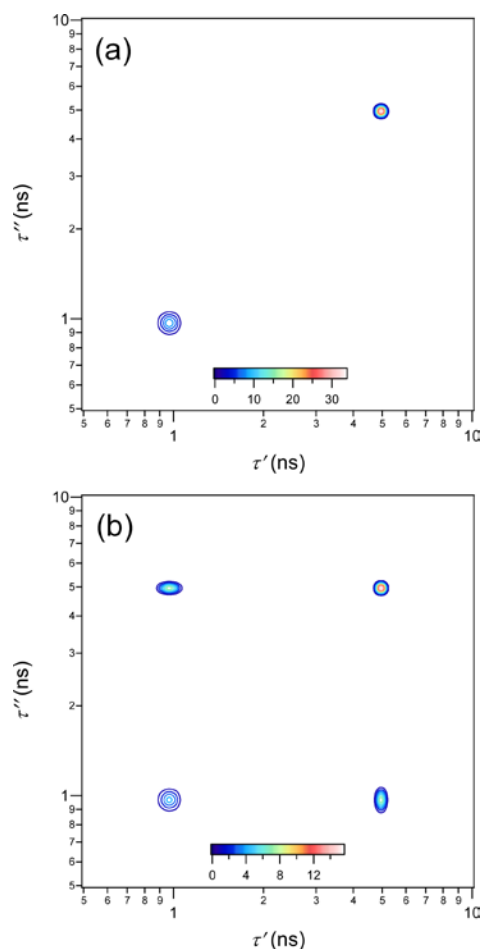


図 2 動的モンテカルロシミュレーションデータの解析例。(a)交換反応前、(b)反応後の二次元蛍光寿命相関マップ。

光子間隔解析による単一光子アバランシェフォトダイオードの 時間軸変動の補正

乙須拓洋, 石井邦彦, 田原太平

理研・田原分子分光

我々が開発を進めている蛍光寿命の情報を利用した新しい蛍光相関分光法 (FCS) [1,2] においては、少数の分子が発する蛍光信号を高感度かつ高時間分解能で観測するための検出器の性能が本質的に重要となる。近年の技術の進歩により、高感度（量子効率数十%）と高時間分解能（最短 100 ピコ秒以下）を兼ね備えた単一光子アバランシェフォトダイオード（SPAD）が入手可能となり、蛍光寿命イメージング・単一分子分光・FCS における標準的な検出器として広く用いられるようになってきた。ただし、SPAD はその時間応答が顕著なカウントレート依存性を示すため、蛍光強度が揺らぐケースでは蛍光寿命の測定に無視できない影響を与える場合があった。特にこの影響は蛍光信号の揺らぎを計測する FCS において深刻であり、単一の検出器を用いて蛍光寿命の揺らぎを定量する際の障害となっていた。本研究では、蛍光寿命の揺らぎを計測する FCS の測定精度の向上と測定系の効率化を図るため、SPAD の時間応答のカウントレート依存性を詳細に解析し、さらにこれを補正する簡便な方法を考案した[3]。

我々はまず時間応答と検出光子間隔（直前に検出された光子との時間差）の関係に注目し、これを解析することにより SPAD の時間応答のカウントレート依存性を説明することができるかを検討した。時間応答と検出光子間隔をすべての光子について解析するために、時間相関単一光子計数装置（TCSPC）に実装されているタイムタグモードを使って SPAD が出力する光子信号の時間分解計測を行った。この測定モードを用いることで、図 1(a)に示

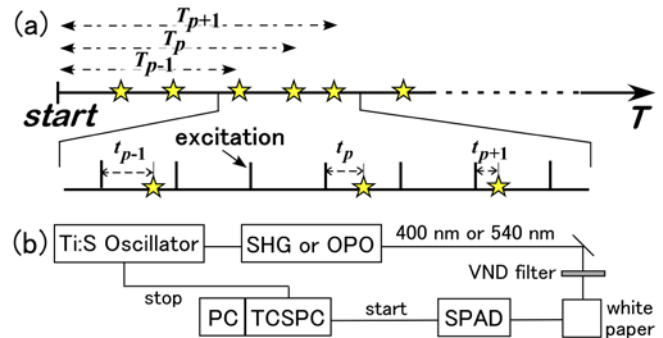


図 1 : (a)得られる光子データ (b)測定に用いた装置の概略図

すように各検出光子の実験開始後からの絶対到着時間（マクロタイム、 T ）と励起後からの相対遅延時間（マイクロタイム、 t ）についての情報を得ることが可能となる。実験は散乱体からの散乱光を SPAD で検出する配置（図 1(b)）で行い、そのマイクロタイムのヒストグラムを評価した。

カウントレートを変えて計測した SPAD の時間応答を見ると（図 2(a)）、時間応答（ピーク時間ならびに半値幅）がカウントレートに大きく依存していることが分かる。そこで、毎秒 200k カウントで得たデータについて、検出光子を検出光子間隔（ $\Delta T_p = T_p - T_{p-1}$ ）によって分類し、検出光子間隔に依存する時間応答関数を抽出した。図 2(b)に示すように、各応答関数は半値幅を変えずにピーク時間のみ変化するような挙動を示した。この結果は、カウントレートに依存した時間応答が検出光子間隔に依存したピーク時間のシフトのみで記述できることを示唆する結果となった。この点について詳細な検討を行うため、異なるカウントレートで測定したデータについても同様に検出光子間隔によって分類し、ヒストグラムを作成、応答関数のピーク時間を検出光子間隔に対してプロットした。その結果、ピーク時間の検出光子間隔依存性はカウントレートに依存しないことが明らかとなった（図 2(c)）。このことから、カウントレートではなく直前の光子との時間間隔が SPAD の時間

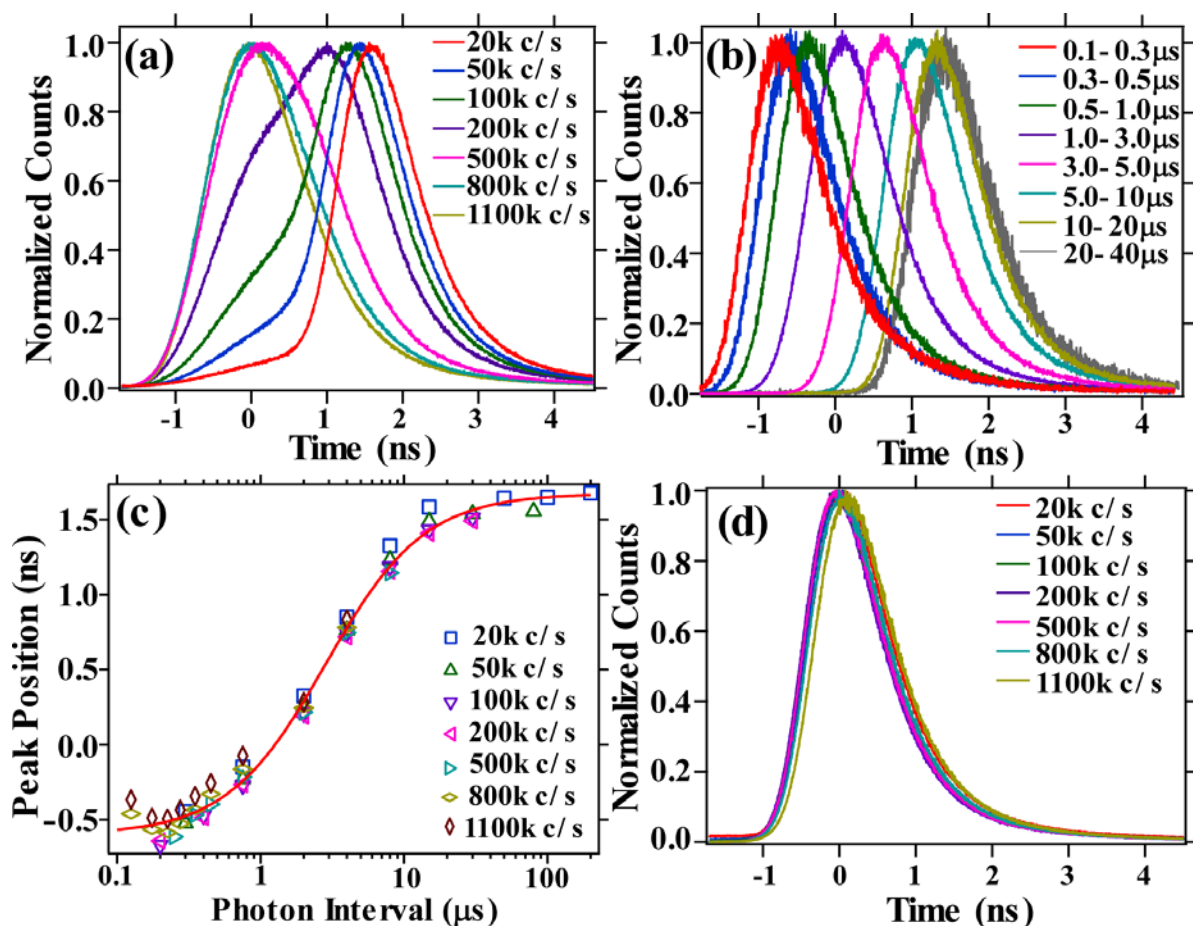


図2 (a) カウントレートに依存した応答関数 (b) 光子間隔に依存した応答関数
(c) 光子間隔に依存した応答関数のピーク時間 (d) (a)の光子データに関して補正を行った応答関数

軸変動の唯一の決定因子であることが示された。

この結果を受けて、我々はカウントレートに依存した時間軸変動を補正する簡便な方法を提案した[3]。提案した補正法では、まず検出光子間隔に依存したピーク時間（図 2(c)）を理論式（本研究では Hill の式）によりフィッティングし補正カーブを得る。その後、得られた補正カーブと各検出光子の検出光子間隔をもとにマイクロタイムの補正を行う。実際に、得られた光子データについて補正を行った結果、補正前に見られた時間応答のカウントレート依存性は解消し、すべてのカウントレートにおいて同一の時間応答が観測された（図 2(d)）。このことは今回我々が提案した補正法の有用性を示す結果となった。本研究ではこの補正法の汎用性を調べるために、異なる波長、ならびに異なる検出特性を持った SPAD で得た光子データについても同様の補正を行った。その結果、本研究で提案した補正法は、他波長、ならびに異なる特性を有する SPAD に対しても適用可能であることが分かった。この方法を用いて、蛍光寿命をもとにした生体分子システムのマイクロ秒ダイナミクス解析の精度が飛躍的に向上することが期待される。

【参考文献】

- [1] Ishii, K.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 12383.
- [2] Ishii, K.; Tahara, T. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *519-520*, 130.
- [3] Otsu, T.; Ishii, K.; Tahara, T. *Rev. Sci. Instrum.* **2013**, *84*, 036105.

蛍光分光法を用いたハイドロゲルの局所環境の研究： 超高強度ダブルネットワークゲルとシングルネットワークゲルの比較

服部達哉¹, 石井邦彦¹, 富永大輝², 長田義仁², 田原太平¹

理研・田原分子分光¹, 理研・分子情報ユニット²

近年、高含水率と人体軟組織に匹敵する強度を併せもつハイドロゲルが開発され、生体組織を代替しうる材料として注目を集めている。DN ゲルは2種類のポリマーから構成され、最適化された DN ゲルでは~90%の含水率ながら、機械的強度は構成成分ゲルのそれぞれ PAMPS (poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)、PAAm (polyacrylamide)の 100~1000 倍にも及ぶ[1]。ポリマー鎖により形成される数 nm オーダーのゲル網目格子中では水のダイナミクスが制限される。ゲル中の水は、熱分析などにより、大部分が液体の水と同様の状態であることが知られているが、ダイナミクスについての情報は不十分であった。本研究では、DN ゲルとその構成成分ゲルを用い、定常蛍光スペクトル測定とピコ秒時間分解蛍光測定を使用して蛍光プローブの局所環境を調べ、ゲルを構成する水・ポリマー鎖の構造とその機能・特性への関連を考察した[2]。

用いた蛍光プローブ分子 (C6H) は、発光波長のシフト、蛍光寿命の変化を通して局所環境のプローブとして働くが、ゲル中での定常蛍光スペクトル、蛍光寿命は水溶液中とほぼ同様の結果を示した。また、定常蛍光スペクトルの形状は励起波長依存性を示さなかった。これは、ゲル中のプローブ分子がほぼバルクの水溶液中と同様の極性環境に存在し、ポリマー鎖との相互作用やポリマー鎖の作る疎水性環境に存在する割合は無視できる程度であることを示唆している。

次に、以下のように定義される時間分解蛍光異方性減衰の測定を行った (図 1)。

$$r(t) = \frac{I_{vv}(t) - I_{vh}(t)}{I_{vv}(t) + 2I_{vh}(t)}$$

$I_{vv}(t)$, $I_{vh}(t)$ はそれぞれ励起光に対して平行、垂直な蛍光減衰成分である。PAMPSゲル中のプローブ分子は水溶液中と同様の速い回転緩和を示した。PAMPSゲルは用いたゲル中、最も含水率が高く (~98 %)、また架橋点間距離が数nm程度との報告[3]があることからプローブ分子が自由回転するのに十分な大きさの領域が存在し、バルクの水と同様の性質を示す水 (自由水) が存在することが示唆される。

一方、PAAmとDNゲル中の異方性減衰データは水溶液中での緩和と同程度の速い回転緩和に加え、遅い緩和成分が観測された。この結果と、DNゲル中でのPAAmがPAMPSよりモノマー比にして 20 倍多いことから、DNゲル中での遅い回転緩和はPAAmポリマー鎖の影響が支配的であることが示唆される。PAAmとDNゲル中での遅い回転緩和は、PAAmポリマー鎖の形成するゲル網目中のconfined water領域に存在し、局所的に粘性の高い環境で回転を阻害されたプローブ分子に起因すると考えられる。

本研究で得られた蛍光異方性減衰を利用した蛍光プローブ分子の局所環境下での回転緩和ダイナミクスの測定結果は、中性子小角散乱のデータをもとに提案された定性的なポリマーネットワークの構造モデル[1]を用いて説明できる (図 2)。すなわち、PAMPS ゲルは架橋剤により形成された

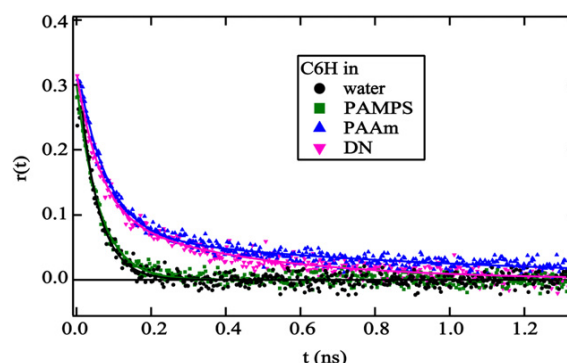


図 1. 各ゲル中における C6H の蛍光異方性減衰。

枝分かれ構造により、プローブ分子がバルクの水溶液中と同様自由回転できる十分大きな空間が存在する。一方、PAAmゲルは直鎖状のフレキシブルなポリマー鎖から成るため、ポリマー鎖自身の絡み合いによりゲル網目格子のサイズが数 nm の confined water 領域が形成される。実験的にもPAMPSゲル中の架橋点間距離のような構造パラメータはPAAmゲルでは得られていない。DNゲル中ではPAAm鎖がPAMPS鎖とも絡み合い、より複雑なポリマーネットワーク構造を形成することで単独のゲルに比べてDNゲルが異常な強度を示すと考えられる。

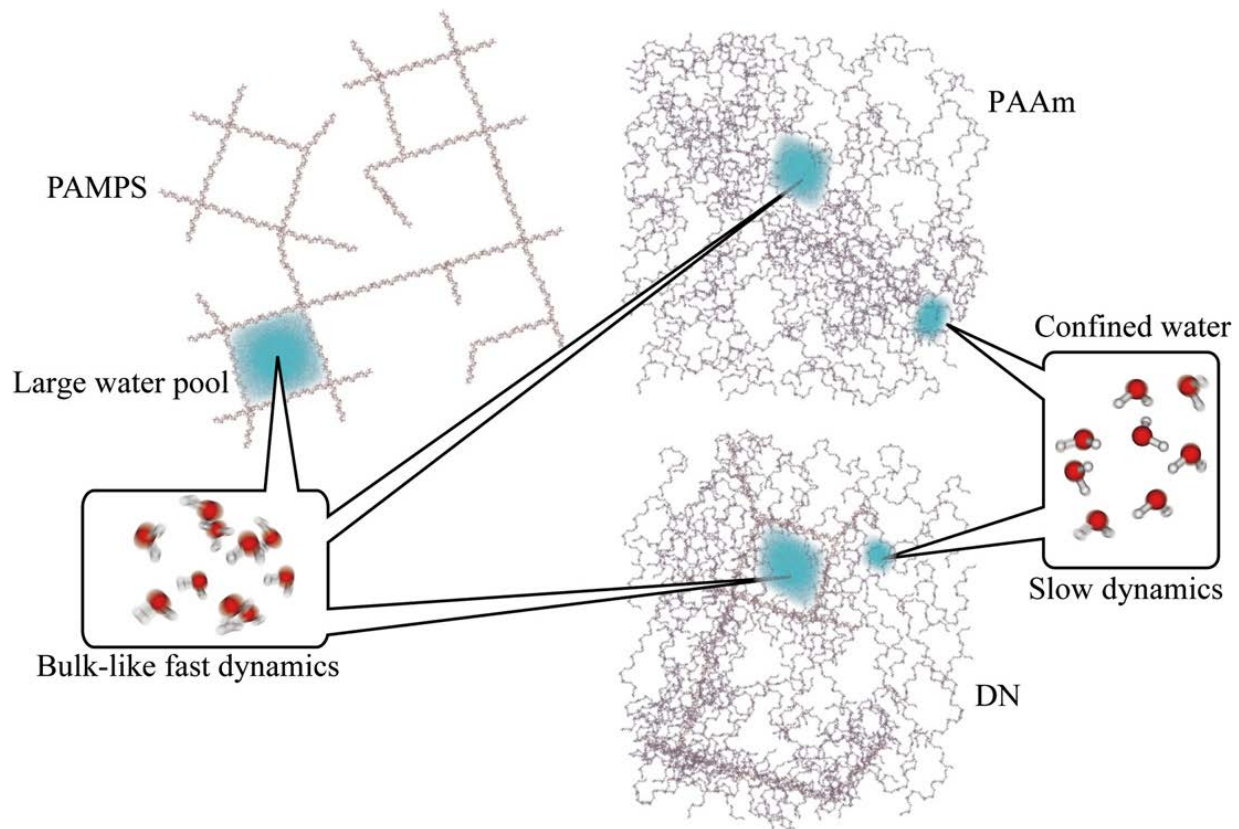


図2. 各ゲル中で局所環境のモデル。

【参考文献】

- [1] Gong, J. P. *Soft Matter* **2010**, 6, 2583.
- [2] Hattori, T.; Ishii, K.; Tominaga, T.; Osada, Y.; Tahara, T. *Chem. Phys.* in press.
- [3] Tominaga, T.; Tirumala, V. R.; Lee, S.; Butler, P. D.; Lin, E. K.; Gong, J. P. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 3903.

ヘテロダイン検出電子和周波発生分光による水の表面のpH測定

山口祥一, 田原太平

理研・田原分子分光

水の表面はバルクよりも酸性なのか塩基性なのか、さかんに議論されている。そのきっかけは、Jungwirthらによる分子動力学 (MD) シミュレーションの研究であった¹。彼らは、水の表面とバルクでのヒドロニウムイオン (H_3O^+) の自由エネルギーの差をMDシミュレーションによって計算した。そして H_3O^+ は表面ではバルクよりも 3 kcal mol⁻¹ 安定で、それによって表面の pH はバルクよりも 2.2 低くなる、と結論した。これは、振動和周波発生 (VSFG) ^{2,3} と第二高調波発生 (SHG) ^{4,5} のいくつかの実験によって定性的に支持された。しかしその一方、界面・コロイド化学者からはほとんど支持されていない。なぜなら純水中の気泡や油滴が負の電荷を帯びることは、長く確立された実験事実であり、これはプロトンの方が水酸化物イオン (OH^-) よりも水に対する親和性が高く、 OH^- が気体/水界面や油/水界面に優先的に吸着するためである、と解釈されているからである⁶。気泡の電気泳動の pH 依存性の実験では、バルクの pH 4.3 以下では気泡のゼータ電位は正 (つまり気泡は正に帯電)、4.3 以上ではゼータ電位は負になることが報告されている⁷。Beattie⁸ は、この実験結果などをもとに、水の表面の pH はバルクよりも約 3 高い、と強く主張している⁸。エレクトロスプレー質量分析の実験も電気泳動と整合する結果を与えると考えられている⁹。

以上のように、水の表面の pH について正反対の2つの主張がある中で、我々は独自に開発したヘテロダイン検出電子和周波発生 (HD-ESFG) 分光法¹⁰⁻¹⁵ を水の表面の pH 指示薬に適用し、初めてバルクの pH 測定と同じ原理の測定を表面に対して行なった。図1(a)に pH 指示薬の酸塩基平衡式を示す。この pH 指示薬はそのアルキル鎖によって界面活性であり、バルクの水に溶解しない。図1(b)と(c)は HD-ESFG によって測定した水の表面の pH 指示薬の二次非線形感受率 ($\chi^{(2)}$) スペクトルの虚部と実部である。 $\chi^{(2)}$ の虚部は紫外可視吸収スペクトルに対応する absorptive なバンド形を示し、実部は dispersive なバンド形を示す。表面の吸着脱離平衡は pH を変えても移動しないので、スペクトルのバルク pH 依存性は pH 指示薬の酸塩基平衡の移動のみによる。虚部と実部の

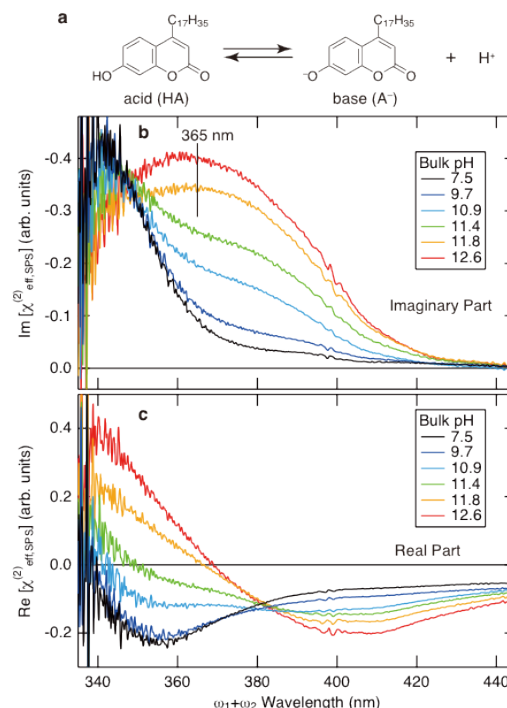


図 1. (a) pH 指示薬の酸塩基平衡。 (b, c) 水の表面の pH 指示薬の $\chi^{(2)}$ スペクトルの (b) 虚部と (c) 実部。バルクの pH を図中に示す。

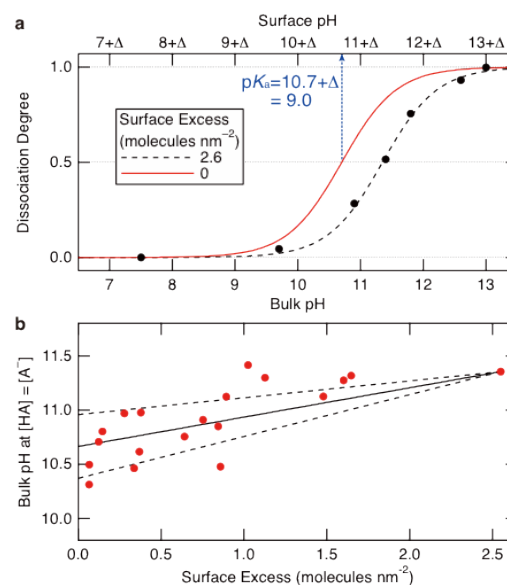


図 2. (a) pH 指示薬の解離度の pH 依存性。黒丸は図 1(b, c) のデータから得られた解離度で、破線はフィット。赤線は (b) から得られた、表面過剰ゼロの極限での解離度。 (b) 解離度 0.5 を与えるバルク pH の表面過剰依存性。赤丸は実験データで、実線はフィット。破線は誤差の範囲を表す。

いずれのスペクトルも、バルクpHによって値の変化しない“等吸収点”を示している。このことは測定の信頼性を担保すると同時に、紫外可視吸収スペクトルによって酸塩基平衡の定量を行なうのと全く同じようにしてこれらの $\chi^{(2)}$ スペクトルを解析できることを意味している。

図2(a)は図1(b), (c)のデータを解析して得られた指示薬の解離度のバルクpH依存性である。バルクのpH 11.4のとき解離度は0.5となっている。これは指示薬の表面過剰が 2.6 nm^{-2} の場合であるが、図2(b)の実験結果が示す通り、表面過剰を減らすと解離度0.5を与えるpHは減少する。表面過剰ゼロの極限では、バルクpH 10.7のとき解離度0.5となり、図2(a)の赤線がこれに対応する。通常、解離度0.5を与えるpHは pK_a であるが、図2(a)の赤線の示すバルクpH 10.7は指示薬の pK_a には対応しない。なぜなら、図2(a)では表面の指示薬の解離度がバルクのpHに対してプロットされているからである。バルクではなく表面のpHに対してプロットすれば、 pK_a を得ることができる。そこで表面とバルクのpHの差を Δ とすると、図2(a)の上の横軸により解離度を表面pHに対して仮想的にプロットすることができる。この場合、表面での pK_a は $10.7 + \Delta$ と表すことができる。

pK_a は図1(a)の酸から塩基への反応の標準反応ギブズエネルギー ($\Delta_r G^\circ$) によって与えられる。 $\Delta_r G^\circ$ は酸、塩基、プロトンの標準化学ポテンシャル (μ°) で決まる。 μ° はその化学種の周囲の環境に依存する。今回の酸塩基平衡系の周囲の環境は、塩基の溶媒和発色によって評価できることが報告されている¹⁶。図3(a)は塩基の紫外可視吸収のピーク波長と環境の（実効的）比誘電率の関係を示している。図1(b)の塩基の $\chi^{(2)}$ の虚部のピーク波長は365 nmなので、水の表面の実効的比誘電率は39と決定される。さらに図3(b)に示すように、比誘電率と pK_a の関係も混合溶媒を用いて既に測定されている¹⁷。バルクの水（比誘電率78）では pK_a は7.8であるが、誘電率が低くなるほど pK_a は大きくなり、実効的比誘電率39の表面では pK_a は9.0である。解離度から求められた pK_a $10.7 + \Delta$ と、溶媒和発色から求められた pK_a 9.0は同一なので、 Δ は -1.7 となる。今回の研究によって、表面はバルクよりも酸性であることが初めて定量的に示された¹⁸。

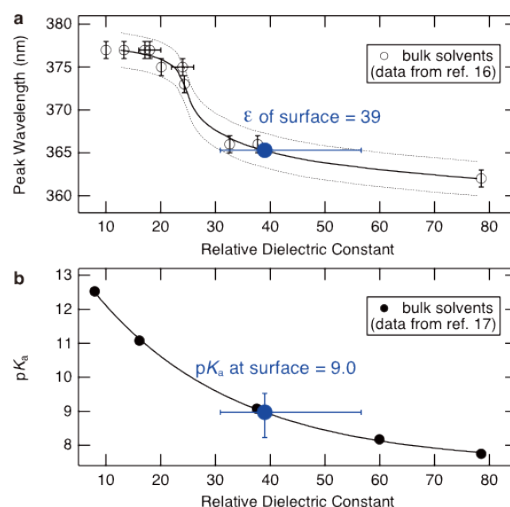


図 3. (a) pH 指示薬の共役塩基の紫外可視吸収のピーク波長と比誘電率の関係。白抜き丸と実線は文献 16 のデータで、点線は誤差の範囲を表す。青丸は水の表面の pH 指示薬のピーク波長 365.3 nm を実線上にプロットしたもので、表面の実効的比誘電率 39 を与える。(b) pH 指示薬の pK_a と比誘電率の関係。黒丸と実線は文献 17 のデータ。青丸は水の表面の実効的比誘電率 39 を実線上にプロットしたもので、表面での pK_a 9.0 を与える。

【参考文献】 [1] Buch *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7342. [2] Mucha *et al.* *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 7617. [3] Tarbuck *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14519. [4] Petersen *et al.* *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 7976. [5] Petersen *et al.* *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *458*, 255. [6] 例えば「界面・コロイド化学の基礎」北原文雄[講談社]. [7] Takahashi *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21858. [8] Beattie *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 330. [9] Enami *et al.* *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 1599. [10] Yamaguchi *et al.* *J. Chem. Phys.* **2008**, *129*, 101102. [11] Watanabe *et al.* *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 144701. [12] Mondal *et al.* *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 3083. [13] Yamaguchi *et al.* *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 4168. [14] Yamaguchi, *et al.* *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 184705. [15] Yamaguchi *et al.* *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 194705. [16] Drummond *et al.* *Photochem. Photobiol.* **1987**, *45*, 19. [17] Fernández *et al.* *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 1755. [18] Yamaguchi, *et al.* *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 151101.

Three Distinct Water Structures at a Zwitterionic Lipid/Water Interface Revealed by Heterodyne-Detected Vibrational Sum Frequency Generation

J. A. Mondal[†], S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, and T. Tahara

Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN

Present Address: [†]Radiation & Photochemistry Division, Bhabha Atomic Research Centre, Mumbai 400085, India.

Lipid/water interfaces and associated interfacial water are vital for various biochemical reactions, but the molecular-level understanding of their property is very limited. We investigated the water structure at a zwitterionic lipid monolayer/water interface using heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (HD-VSFG) spectroscopy.¹ To investigate interfacial water properties at the lipid/water interfaces, we used three different model lipids with varying headgroup structures. Figure 1 shows the chemical structures of these lipids; 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), and 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium propane (DPTAP), respectively. Isotopically diluted water was utilized in the experiments to minimize the effect of intra/intermolecular couplings.²

Figure 2 shows the imaginary part of $\chi^{(2)}$ ($\text{Im}\chi^{(2)}$; $\chi^{(2)}$ is the second-order nonlinear susceptibility) spectra of POPC (black), DPPG (red), and DPTAP (blue)/water interfaces in the OH stretch region. The $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectra of anionic DPPG interface has a positive sign, which indicates net hydrogen-up (H-up) orientation of interfacial water at these interfaces.¹ In the case of a cationic DPTAP/water interface, the $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectrum has a negative sign corresponding to the net hydrogen-down (H-down) orientation of interfacial water. For these charged lipids, interfacial water orientation is governed by the net electric field at the interface.³ In the case of the neutral zwitterionic lipid (POPC), there is no net electric field at the interface and, hence, the net water orientation at POPC/water interface depends on the preferred orientation of water in the close vicinity of the phosphate and choline groups and on the net dipole moment at the interface. It was found that the OH stretch band in the $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectrum of the POPC/water interface exhibits a characteristic double-peaked feature with a dip at $\approx 3470\text{ cm}^{-1}$ (black line, Figure 2).⁴

To interpret this peculiar spectrum of the POPC/water interface, $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectra of a zwitterionic surfactant/water interface and mixed lipid/water interfaces were measured. The $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectrum of the zwitterionic surfactant/water interface clearly shows both positive and negative bands in the OH stretch region, revealing that multiple water structures exist at the interface.⁴ At the mixed lipid/water interfaces, while gradually varying the fraction of the anionic and cationic lipids, we observed a drastic change in the $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectra, in which the spectral features similar to the anionic, zwitterionic, and cationic lipid/water interfaces appear successively. These observations demonstrate that, when the positive and negative charges coexist at the interface, the H-down oriented water structure and H-up oriented water structure appear in the vicinity of the respective charged sites. In addition, it was found that a positive $\text{Im}\chi^{(2)}$ appears around 3600 cm^{-1} for all the monolayer interfaces examined, indicating weakly-interacting water species existing in the hydrophobic region of the monolayer at the interface. Based on these results, we concluded that the characteristic $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectrum of the zwitterionic lipid/water interface arises from three different types of water existing at the interface: (1) the water associated with the negatively charged phosphate, which is

strongly H-bonded and has a net H-up orientation, (2) the water around the positively charged choline, which forms slightly weaker H-bonds having a net H-down orientation, and (3) the water weakly interacting with the hydrophobic region of the lipid, which has a net H-up orientation. These results are the first spectroscopic evidence of the preferred water orientation and distinct water structures at zwitterionic lipid/water interfaces, which play a crucial role in many important biochemical reactions.

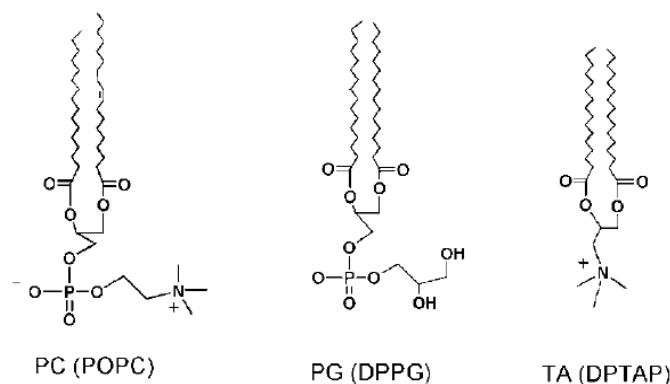


Fig. 1. Chemical structures of three model lipids. POPC is a zwitterionic (neutral) lipid.

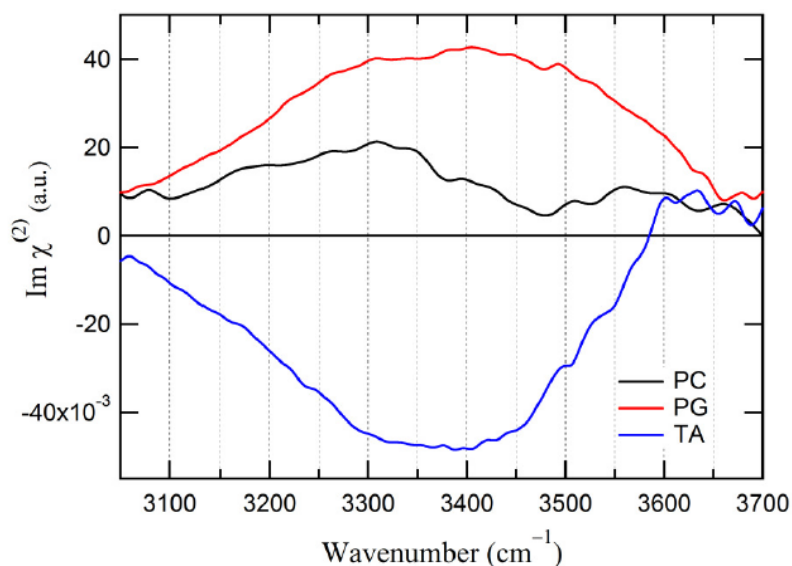


Fig. 2. $\text{Im} \chi^{(2)}$ spectra of PG (red), TA (blue), and PC(black)/water interfaces in OH stretching region, measured with ssp polarization combination and surface pressure $\sim 25 \pm 3$ mN/m. Instead of neat water, isotopically diluted water ($\text{H}_2\text{O}/\text{HOD}/\text{D}_2\text{O} = 1/8/16$) was used.

References

- (1) Nihonyanagi, S.; Yamaguchi, S.; Tahara, T. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 204704.
- (2) Nihonyanagi, S.; Yamaguchi, S.; Tahara, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6867.
- (3) Mondal, J. A.; Nihonyanagi, S.; Yamaguchi, S.; Tahara, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10656.
- (4) Mondal, J. A.; Nihonyanagi, S.; Yamaguchi, S.; Tahara, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7842.

レプリカ交換分子動力学計算による糖鎖立体構造予測

李秀栄¹, 二島渉¹, 宮下尚之², 山口芳樹³, 杉田有治^{1, 2}

理研・杉田理論分子科学¹, 理研・QBiC², 理研・糖鎖構造生物学

糖鎖は細胞表面に多く存在し、細胞接着やウイルス感染など細胞間の認識で重要な役割を果たす。細胞表面には、種類や長さ、分岐構造の異なる多種の糖鎖が存在しており、それらがどの様にして認識相手を識別しているかは未だ明らかでない。糖鎖は高い運動性をもつ分子であり、溶液中では、単一の安定構造ではなく、多様なコンフォマーの混合物として存在していると考えられる。受容体が糖鎖を認識する場合には、従来の「鍵と鍵穴」モデルで説明されるタンパク質-リガンド認識とは異なり、コンフォマー各々が特定の受容体に対する鍵となる「複数鍵」モデルが有力な機構として提唱されている(図1)。

しかし、柔軟性の高い糖鎖は従来の構造生物学的手法(特にX線結晶構造解析)による構造決定が極めて困難である。近年、計算機を用いた分子シミュレーションでも新しい手法が開発され、糖鎖の計算においてもNMRなどの実験結果と比較しうる結果が得られつつある。私たちのグループでは、タンパク質の立体構造予測などで用いられてきたレプリカ交換分子動力学法¹を用いた糖鎖の立体構造予測に取り組んできた。この手法では、温度の異なる複数のレプリカ(系のコピー)の分子動力学計算を並列・独立に実行し、ある頻度で隣接する温度を交換することで定温の分子動力学計算では実現できない幅広い構造探索を可能にする。この方法を用いることで、従来のシミュレーションが小さな糖鎖モデル(2~3糖)の構造探索に限られてきたのに対して、大きな糖

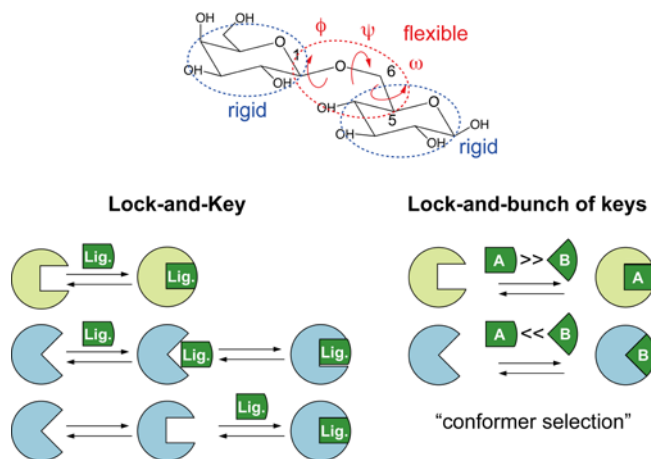


図1. 糖鎖認識の「複数鍵」モデル

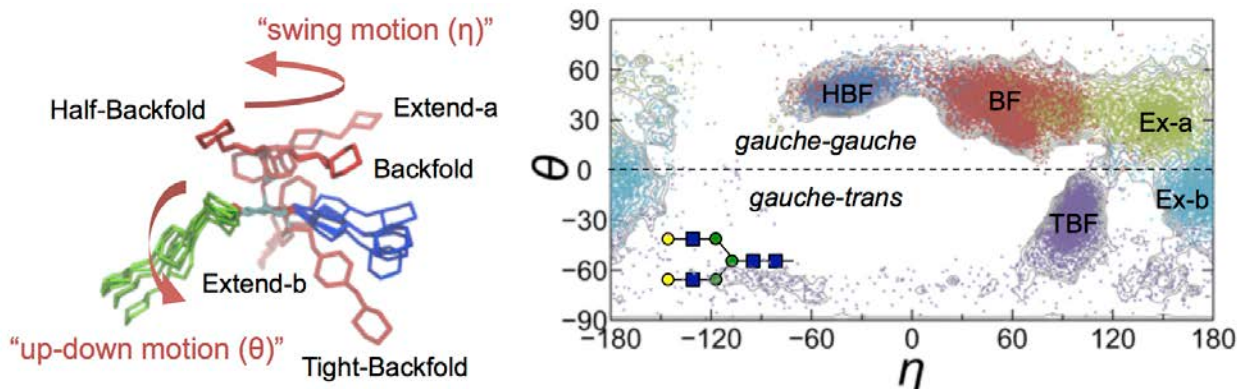


図2. REMD 計算から得られた N 型複合型糖鎖の立体構造分布

鎖の多様なコンフォメーションを十分に探索することが出来る。私たちはこれまでに、代表的な糖鎖であるN型複合型糖鎖の水中での立体構造分布を予測し、NMR実験のデータと良く一致する結果を得ることに成功した（図2, 3）。² 計算結果は、水中N型複合型糖鎖が明瞭に区別しうる5つのコンフォマーをとっていることを示す。さらに、全てのN型複合型糖鎖に共通するコア構造（ペンタサッカライド部分）にN-アセチルグルコサミンやフコースといった修飾基を導入することで、各コンフォマーの相対分布が顕著に変化し、特定のコンフォマーが安定化されることを明らかにした。この結果は前述の「複数鍵」モデルを支持し、受容体タンパク質による糖鎖認識で構造多形性が本質的に重要であることを示唆する。

同様の計算手法を用いた別の試みとして、糖鎖のイオンモビリティ質量分析（IM-MS）データの予測も行った。質量分析は、糖鎖構造解析の有力な手段として広く用いられているが、糖鎖異性体の分離・同定は未だ大きな課題の一つである。IM-MSは、分子の衝突断面積の違いを利用することで、糖鎖異性体の分離同定を実現する手法として期待される。私たちは、レプリカ交換分子動力学計算により得られた立体構造分布に対して衝突断面積を計算するプロトコルを開発し、簡単なN型糖鎖異性体ペアについて実験データと良く一致する結果を得た。³ 計算から得られた立体構造のアンサンブルを解析した結果、マンノース1-3分枝にガラクトースが付加した場合に分岐鎖が還元末端側へ折り返ったコンパクトな構造を形成する傾向が見出された（図4）。本結果は、糖鎖異性体間に観測されたドリフト時間の違いをよく説明できる。

【参考文献】

- (1) Sugita, Y., & Okamoto, Y. (1999). *Chem. Phys. Lett.*, 314: 141–151.
- (2) Re, S. et al. (2011). *Biophys. J.*, 101: L44–46. Nishima, W. et al. (2012). *J. Phys. Chem. B*, 116: 8504–8512. Re, S. et al. (2012). *Biophys. Rev.*, 4: 179–187.
- (3) Yamaguchi, Y. et al. (2012) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26: 2877–2884.

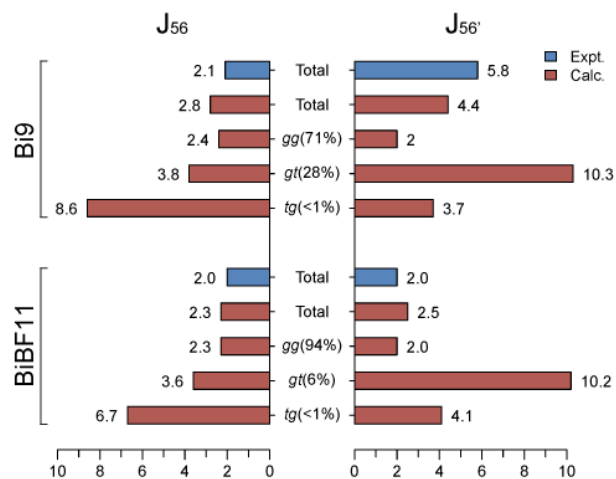


図3. 2種のN型複合型糖鎖のスピ結合定数

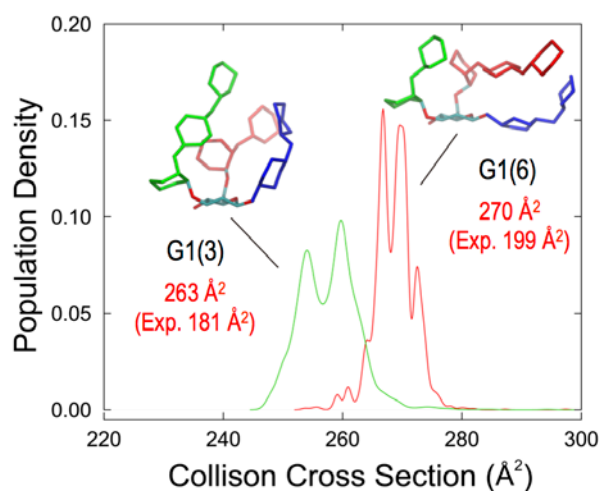


図4. N型糖鎖異性体ペアの衝突断面積

Structure Prediction of Glycans by using the Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations

Suyong Re¹, Wataru Nishima¹, Naoyuki Miyashita², Yoshiki Yamaguchi³, Yuji Sugita^{1,2}

¹Theoretical Molecular Science Laboratory, RIKEN, ²Laboratory for biomolecular function simulation, RIKEN

QBiC, ³Structural Glycobiology Team, RIKEN

N-glycan plays an important role in the recognition process regulating higher order biological functions such as cell-to-cell communications. In general, glycan consists of rigid saccharide units linked together through flexible glycosidic bonds and this arrangement gives rise to multiple conformers in solution. Experimental evidences insist that each receptor protein recognizes one distinct conformer (a particular “key”) among multiple conformers (“bunch of keys”) (Fig. 1). To clarify this, atomically detailed structural information of N-glycans is necessary, which is not normally accessible by experiment.

We performed extensive molecular dynamics simulations of N-glycans in solution using the replica-exchange molecular dynamics (REMD) method¹ that significantly enhances conformational sampling. We simulate four biantennary complex-type N-glycans, namely, unmodified, two single-substituted with either bisecting GlcNAc or core fucose, and di-substituted forms.² We observed five distinct conformers in solution, each of which is characterized by its local orientation of the Man α 1-6Man glycosidic linkage, for all four N-glycans (Fig. 2). The chemical modifications significantly change their conformational equilibria. For example, the introduction of bisecting GlcNAc reduces the number of major conformations from five to two. The population change is attributed to specific inter-residue hydrogen bonds, including both direct and water-mediated bonds. The calculated NMR data, including nuclear Overhauser enhancement and scalar J-coupling constants, well agree to the experimental values, when the multiple conformers are taken into

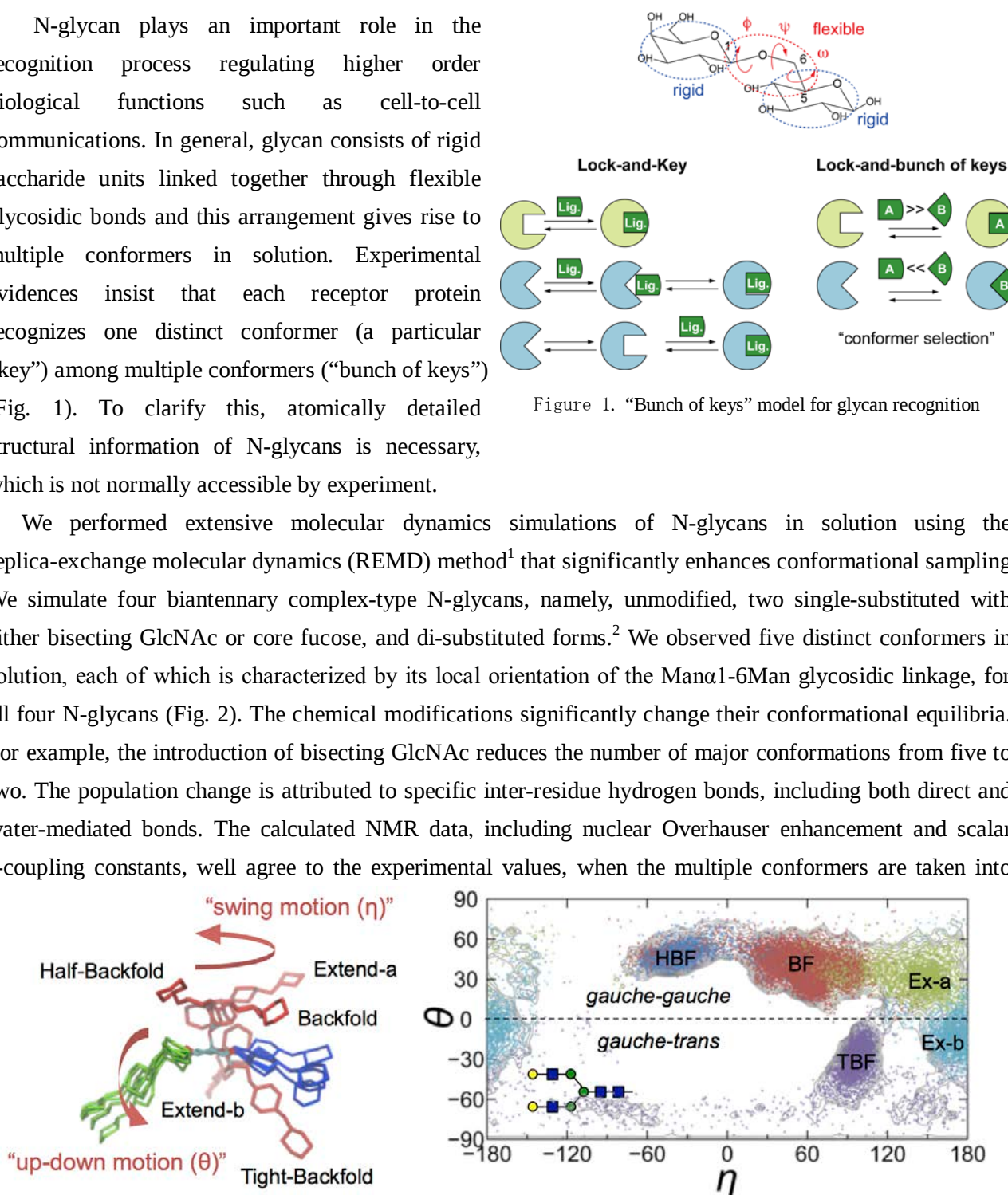


Figure 2. Multiple conformers of the N-glycan obtained from the REMD simulations

account (Fig. 3). Our structural model supports the concept of “conformer selection”, which emphasizes the importance of conformational flexibility of N-glycans in protein-glycan interactions.

We also applied the REMD simulations to predict the data from Ion mobility mass spectrometry (IM-MS). Mass spectrum is indispensable for glycans’ structure analysis.³ A central issue in glycan mass analysis is the separation and identification of the isomeric glycans. IM-MS has the potential to separate

isomeric glycans by utilizing their unique collisional cross section. In order to understand the structural basis of the observed differences in drift time, we performed REMD simulations of a set of isomeric PA-glycans, G1(3) and G1(6), and calculated the collisional cross sections for each glycan. The calculated cross sections are in good agreement with the experimental data (Fig. 4). REMD simulations further provide the structural details, where the galactosylated Man α 1-3 branch preferentially folds back to the core chitobiose portion to form a compact structure. The results well explain the observed differences in drift time for these isomeric PA-glycan.

References

- (1) Sugita, Y., & Okamoto, Y. (1999). *Chem. Phys. Lett.*, 314: 141–151.
- (2) Re, S. et al. (2011). *Biophys. J.*, 101: L44–46. Nishima, W. et al. (2012). *J. Phys. Chem. B*, 116: 8504–8512. Re, S. et al. (2012). *Biophys. Rev.*, 4: 179–187.
- (3) Yamaguchi, Y. et al. (2012) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26: 2877–2884.

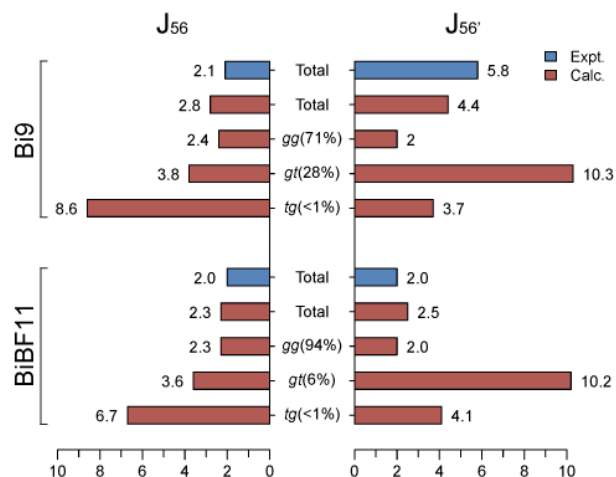


Figure 3. J -spin coupling constants of N-glycans with and without the core-modification

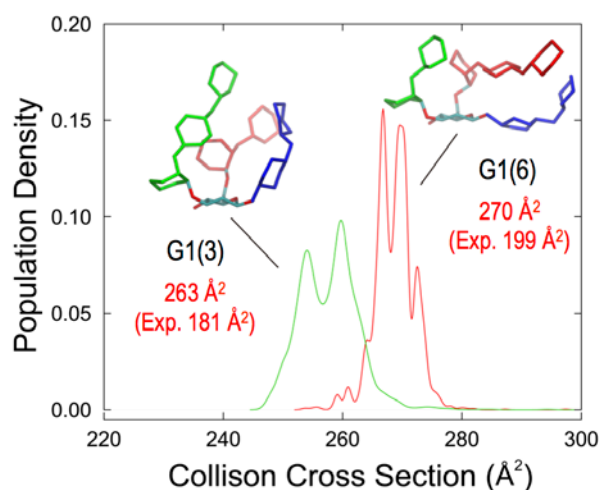


Figure 4. Collisional cross sections of isomeric N-glycans

光 STM の開発及びフタロシアニン単分子の光学特性制御

今田裕¹, 清水智子¹, 今井みやび^{1,2}, 川合真紀², 金有洙¹

理研・Kim 表面界面¹, 東大・新領域²

本研究では、単分子及び数個の分子で構成される分子システムにおける、エネルギー移動や、光子-電子間の相互エネルギー変換を解明・制御することを目的としている。分子間のエネルギー移動や分子システムにおけるエネルギー変換は、光合成に代表される光化学反応の初期過程で重要な役割を果たしており、その解明は化学・物理学だけでなく生物学においても大きな意義を持っている。また、単分子を構成要素とし、自然界に存在しない分子システムを構成し、新たな機能を発現させることは分子デバイスへの応用の観点からも重要であるといえる。

このような目的の実現のため、我々は単分子のマニピュレーションや電子状態測定が可能である超高真空低温走査トンネル顕微鏡 (STM) に光照射・光検出という新たな機能を付け加えた光STMの開発を行った(図1)。性能評価として行ったp-type GaAs(110)表面での測定では、世界最高レベルの性能を確認すると共に(図2)、表面電子状態において電子エネルギーが散逸されることを明らかにした[1]。この光STMを用いて、まずもっとも簡単な分子システムである単分子の発光測定を行った。単分子からのSTMを励起源とした発光測定は、2003年に初報があったがこれまで1グループしか成功しておらず、未解明な部分が多い現象である[2]。

分子にはPhthalocyanine (H_2Pc)を用い、基板には分子を金属から電子的相互作用を遮蔽するために2原子層のNaCl薄膜を成長させたAg(111)表面を用いた。基板を10 Kに冷やした状態で分子を蒸着すると、 H_2Pc 分子はNaCl薄膜上に孤立分子の状態で吸着した。

H_2Pc 分子には中心に2つの水素原子が存在するが、STM 探針から電子を注入することで再現性良く水素原子を1つ1つ脱離させ、 H_2Pc から水素原子が1つの H_1Pc , 水素原子のない H_0Pc を作り出す事に成功した(図3)。中心水素原子の数はトンネル電流の変化を観測することで確認する事ができる。 H_2Pc 分子では2段階のトンネル電流変化が観測され、 H_1Pc では4段階、 H_0Pc ではトンネル電流の変化は観測されなかった(図3右図)。これは、探針直下に水素原子がいる場合に流れるトンネル電流が増加する事と、水素原子の取りうる配置の数が H_2Pc 分子では2パターン、 H_1Pc では4パターン、 H_0Pc では0であることを考慮すると、中心水素原子の数と対応するものと考えられる。

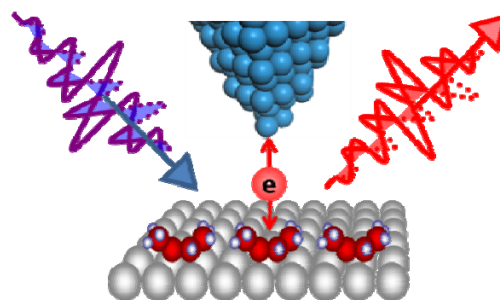


図1. 光 STM の概念図

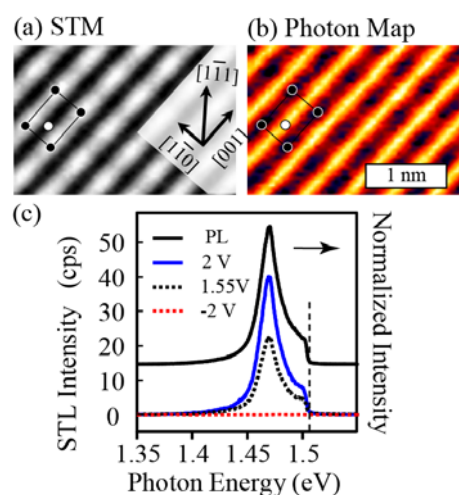


図2. (a)p-type GaAs(110)表面の STM 像。(b)原子分解能 STM 発光像。(c)発光スペクトル。

図4にバイアス電圧を変化させて測定した、 H_2Pc 分子と H_0Pc 分子の STM 発光スペクトルを示す。 H_2Pc 分子においては、バイアス電圧 2.6 V 以上で鋭いピークが 1.8 eV に観測され (P_1)、さらに P_1 の低エネルギー側には分子の振動準位由来であると考えられる一連のピーク群が観測された。一方、 H_0Pc 分子では、 H_2Pc 分子同様 1.8 eV の P_1 及び低エネルギーに続くピーク群が観測されたが、これらの発光のスレッシュホールド電圧は 2.1 V と 500 mV の違いが見られた。これは発光に関与する電子状態が 500 meV 低エネルギー側にシフトしていることを示唆しており、走査トンネル分光法 (STS) による電子状態測定で確かに電子状態がシフトしていることが認められた。

さらに H_0Pc 分子では、 H_2Pc 分子では観測されなかった発光ピークが 1.3 eV に観測された (P_2)。 P_2 の起源に関しては現在検討中であるが、水素原子が抜けたことで大きな変化が生じた分子中心に存在する分子軌道が関与しているのではないかと推察される。分子の光学特性を変化させる他の要因としては、対称性の変化があげられよう。 H_2Pc 分子においては中心水素原子の存在により 2 回対称、 H_0Pc 分子では中心水素がないために 4 回対称であるが、対称性の変化によって光学遷移の選択則から禁制であった遷移が許容に変化した可能性がある。今後さらなる実験・解析を行い、機構を解明する。

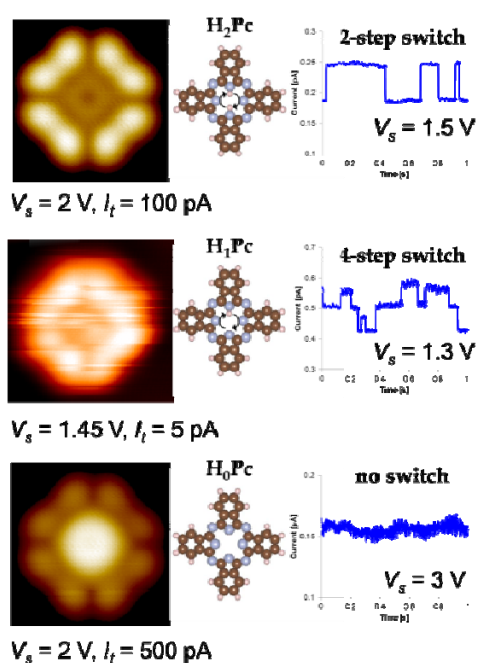


図3. STM 誘起の水素脱離反応。左) フタロシアニン分子の STM 像。右) 水素原子の回転によるトンネル電流変化。

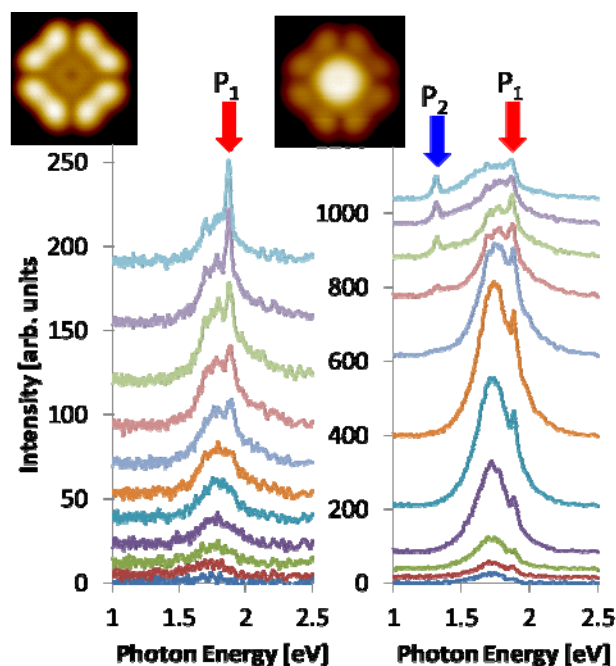


図4. 左) H_2Pc と右) H_0Pc の STM 発光スペクトルのバイアス電圧依存性(下から 2V, 0.1V 刻みで 3V まで)。

【参考文献】

- [1] Imada, H.; Shimizu, K. T.; Yamamoto, N.; Kim, Y. submitted.
- [2] Qiu, X. H.; Nazin, G. V.; Ho, W. Science **2003**, 299, 542

Au(111)面上の鉄フタロシアニン分子で現れる新奇的な近藤効果

南谷英美¹, 塚原規志², 川合真紀², 高木紀明², 金有洙¹

理研・Kim 表面界面¹, 東大・新領域²

近藤効果は、物性物理の教科書でもよく取り上げられる著名な物理現象の一つである。1930 年代に希薄磁性合金における電気抵抗極小現象として発見され、1964 年に近藤淳博士により理論の基盤が築かれて以来、50 年近く理論・実験の両面から精力的に研究が進められている[1,2]。近藤効果の魅力の一つは多様性にあると考えられる。近藤効果はオリジナルの希薄磁性合金だけでなく様々な物質で現れ、さらに、各物質の特性と結びつくことによって興味深い物性を生じる。特に近年、微細加工技術の発展により、ナノ構造において多彩な近藤効果を実現し観測できる可能性が飛躍的に広がっている。とりわけ、走査トンネル顕微鏡(scanning tunneling microscope: STM)を用いると、表面における近藤効果を高いエネルギー・空間分解能で観測することが可能である。このような状況のもと、我々は特に、金属表面上の分子における近藤効果とそのSTM観察に注目し、研究を進めている。

遷移金属フタロシアニン・ボルフィリン等の対称性の良い分子では、近藤効果に関与する中心金属原子の電子状態は配位子場によって決定されている。そのため特定の軌道やスピン状態に由来する、理論・実験の両面で興味深い近藤効果が実現している可能性が高い。さらに、表面に吸着している分子の特長として、STMによる分子操作や化学反応によって、配位子場を変調し、近藤効果を制御することや、物理パラメータと近藤効果の関係を探ることが可能になる。これらの観点から、Au (111) 面上の鉄フタロシアニン (Fe-phthalocyanine: FePc) での近藤効果について、理論・実験の共同研究を行った結果、スピン自由度に加えて軌道自由度が関与する珍しいタイプの近藤効果が生じていることを発見した[3,4]。なお、実験部分は東京大学大学院新領域創成科学研究科 川合・高木研究室が行った。

まず、トポグラフィ像から、Au (111) 面上のFePc には2 つの安定な吸着構造があることが判明した(図1 a)。一つは、Fe 原子がAu 原子の真上に配置するオントップ構造である。もう一つはFe 原子が2 つのAu 原子の隙間上に配置するブリッジ構造である。このオントップ構造とブリッジ構造が安定であるという傾向は、密度汎関数理論 (density functional theory:DFT) による計算結果とも一致した。トポグラフィ像ではオントップ構造とブリッジ構造の違いは中心のFe 原子部分の明るさが微妙に異なるだけであるが、Fe 原子上で測定されたSTS スペクトルは2 つの構造で大きく異なる (図1 c, d)。

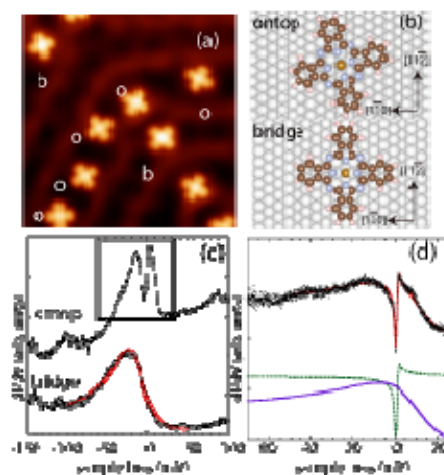


図1 a)Au(111) 面上の FePc の STM トポグラフィ像。o はオントップ構造を、b はブリッジ構造を表す。 b)DFT から得られた安定な吸着構造。 最安定構造がオントップ構造、 2 番目に安定な構造がブリッジ構造に対応する。 c)Fe 原子上で測定した STS スペクトル。d) オントップ構造における STS スペクトルの拡大図。

リッジ構造ではSTS スペクトル中に、半値幅24.9 meV のピーク形状が一つ、フェルミエネルギー近傍に表れる。オントップ構造では、半値幅19 meV のピーク形状に加えて、その内側に半値幅0.6 meV のディップ形状が存在する。これらのピーク形状が近藤効果に由来するのか、そして、なぜ吸着構造によってSTSスペクトルが大きく異なるのかを解明するために、DFTと数値くりこみ群 (numerical renormalization group: NRG) を用いた理論研究を行った。

LDA+U法を援用したDFTによる局所状態密度の計算結果から、オントップ構造とブリッジ構造の違いは、Feの d_{zx}/d_{yz} 軌道の縮重度にあることが判明した(図2 a)。オントップ構造ではこれらの軌道が縮退しているが、ブリッジ構造では縮退がとけている。また、金属表面への吸着に伴う、電子が感じるポテンシャルの変化を描画したところ、オントップ構造ではFe原子近傍のポテンシャルが孤立分子と同様の4回対称性を保っているのに対して、ブリッジ構造では2回対称性へと対称性の低下が起きていることが判明した(図2 b)。 d_{zx}/d_{yz} 軌道の縮重度の違いはこの対称性の違いを反映している。

さらに、NRGを用いて、軌道縮退しているオントップ構造と、 d_{zx}/d_{yz} 軌道間にエネルギーの差があるブリッジ構造でのSTS スペクトルを計算し、スペクトル幅から近藤温度を評価した。実験的に得られたSTS スペクトルの幅と温度依存性からは、オントップ構造での近藤温度は2.7 Kと考えられる。計算で得られたオントップとブリッジ構造におけるスペクトルの幅の比からブリッジ構造の近藤温度を見積もると0.2 Kとなり、実験温度が0.4 Kであることを合わせて考えると、ブリッジ構造では細いディップ形状が現れない原因を説明できる。

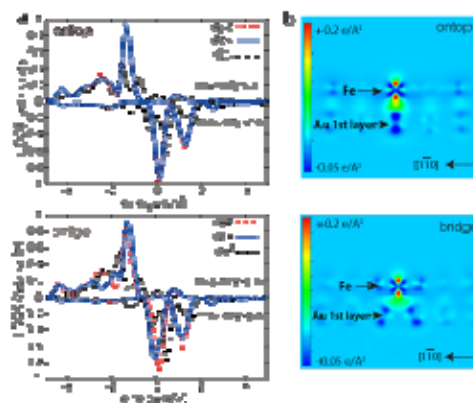


図2 a) オントップ・ブリッジ構造における d_{zx} 、 d_{yz} 、 d_{z^2} 軌道に射影した Fe 原子における局所状態密度。b) 各吸着構造における差電荷分布の断面図。

【参考文献】

- [1] J. Kondo, Prog. Theor. Phys. 32, 37 (1964). [2] A. C. Hewson, *The Kondo Problem to Heavy Fermions* (Cambridge Univ. Press, Cambridge 1993). [3] Minamitani E., Tsukahara N. Matsunaka D. Kim Y. Takagi N. Kawai M.:Phys. Rev. Lett., 109, 086602 (2012). [4] 南谷英美、塚原規志、金有洙、高木紀明：日本物理学会誌 2013年3月号 最近の研究から

Thermal reaction and stability reversal of photochromic diarylethene on Au(111) and Cu(111) studied by scanning tunneling microscopy

Tomoko Shimizu, Jahoon Jung, Hiroshi Imada, Yousoo Kim

Surface and Interface Science Laboratory, RIKEN

Adsorption of molecules on solid surfaces often alters intrinsic molecular properties. Considering a potential application of molecules as components of molecular devices such as semiconducting wires, rectifiers and switches, it is crucial whether the expected and desired properties of the molecules are preserved or changed. It is therefore essential to fully understand adsorption states of the molecule of interest.

We have chosen to study one of the photochromic diarylethene (DAE) molecules, 1,2-bis(2,4-dimethyl-5-phenyl-3-thienyl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentene (Fig. 1) [1], adsorbed on Au(111) and Cu(111). Due to isomerization reaction induced by light with two different wavelengths as well as by electronic stimuli, it may function as single molecular switches and ultra-high density memory devices. Thus, various attempts to immobilize the molecules to solid surfaces and photo-response of the immobilized DAE have been extensively studied [2]. The DAE has an advantage over azobenzene and spiroiran for memory applications because no thermal reaction occurs in its single crystalline form [3]. In this study we have investigated at the single molecular level how the properties of DAE are affected by the contact with electrode metals [4].

The experiments were carried out with a scanning tunneling microscope (STM) (Omicron GmbH) operated at liquid helium temperature in ultra-high vacuum (UHV). The clean and atomically flat Au(111) and Cu(111) surfaces were prepared by repeated cycles of sputtering and annealing. Either open-form or closed-form DAE was deposited using a home-made Knudsen cell. Temperature of the substrate during deposition was at room temperature (RT). The sample was then annealed to 355-365 K when necessary.

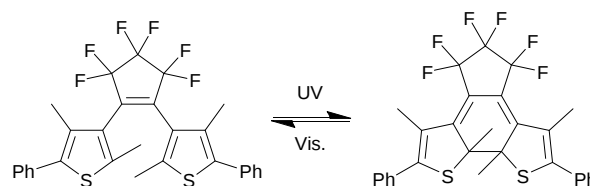


Fig. 1 Molecule used in this study
(Left) open-form (Right) closed-form.

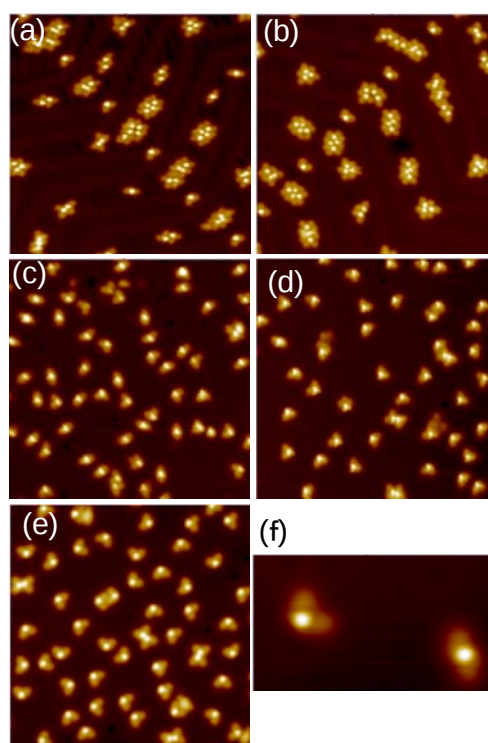


Fig. 2 STM images of DAE on Au(111) (a-b) and Cu(111) (c-d). (a) and (c), (b) and (d) are before and after annealing, respectively. (e) Closed-form deposition on Cu(111). (f) Enlarged image of closed-form (left) and open-form (right) on Cu(111).

Deposition of the open-form DAE on Au(111) produced two types of protrusions corresponding to single molecules in STM images as shown in Fig. 1(a). One has an oval shape and the other appears as an isosceles triangle, both with a bright spot at the center. After annealing the surface to 355-365 K, almost all the molecules turned into the triangular shape (Fig. 1(b)). This observation suggests that the oval-shaped molecules transform into the triangular-shaped molecules by thermal energy. The same phenomenon was observed also on Cu(111) as shown in Fig. 1(c) and 1(d). To clarify the relation between molecular conformation and observed microscopic image, we deposited UV light (375 nm) exposed powder, which contained mostly the dark-blue closed-form, on Cu(111) at RT. On the resulting surface we observed mostly the triangular shape as shown in Fig. 1 (e). It obviously indicates that the triangular-shaped molecules correspond to the closed-form while the oval-shaped ones to the open-form. Therefore, the thermal reactions demonstrated in Fig. 1(a) to 1(b) as well as 1(c) to 1(d) are isomerization reaction from the open-form to the closed-form, which is prohibited in gas-phase, solution and single crystalline form. It also indicates the reversal in thermodynamic stability of two isomers: the closed-form is more stable than the open-form on the Au(111) and the Cu(111) surfaces, which is opposite to gas phase.

In order to support experimental observations on the reversal in thermodynamic stability between the open- and closed-form DAE, we performed density functional theory calculations for isolated molecules. Our computational results indicate that the closed-form is more stable than the open-form when the molecule becomes cationic and anionic states although the open-form is more stable than the closed-form when it is neutral. We further found that the larger amount of decreases in C-C bond lengths and Wiberg bond indices for the closed-form when DAE is ionized, which suggests more effective π -conjugated network connecting the terminal phenyl-rings for the closed-form than the open-form. Experimentally, based on scanning tunneling spectra, we confirmed that on Au(111) the molecule indeed becomes slightly cationic due to partial electron transfer from molecule to the Au substrate. On Cu(111), hybridization of molecular orbitals with Cu electronic states is significant, and we assume that it also noticeably change the conjugated network to stabilize the closed-form.

[Reference]

1. M. Irie, S. Kobatake and M. Horichi, *Science*, **291**, 1769 (2001).
2. W. R. Browne and B. L. Feringa, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **60**, 407 (2009).
3. M. Irie, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **86**, 472 (2010).
4. T. K. Shimizu, J. Jung, H. Imada and Y. Kim, in preparation

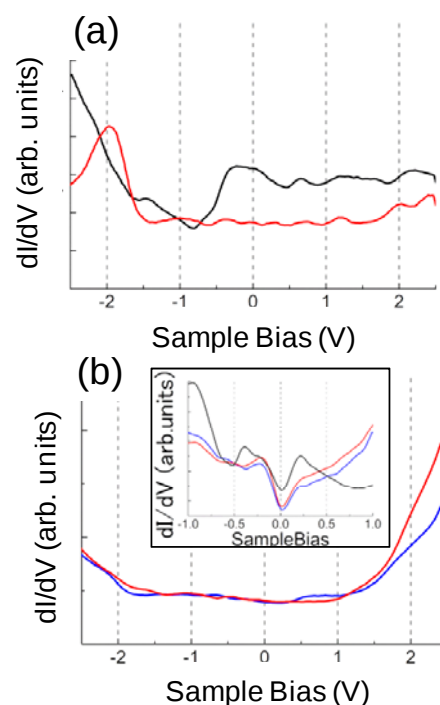


Fig. 3 Scanning tunneling spectra of DAE on (a) Au(111) and (b) Cu(111). Red: closed-form; blue: open-form; black: substrate metal.

Ligand field effect at oxide-metal interface on the chemical reactivity of ultrathin oxide film surface

Jaehoon Jung¹, Hyung-Joon Shin², Maki Kawai³, Yousoo Kim¹

Surface and Interface Science Laboratory, RIKEN¹,

School of Mechanical & Advanced Materials Engineering, Ulsan National Institute of Sci. and Tech., Korea²

Department of Advanced Materials Science, The University of Tokyo²

Ultrathin oxide films grown on metal substrate are of great interest not only as supporting materials for chemically active nanoparticles but also as catalysts in the field of heterogeneous catalysis [1]. Using scanning tunneling microscopy (STM) and density functional theory (DFT) calculations, we have demonstrated that the chemical reactivity for water dissociation on an ultrathin MgO film grown on Ag(100) substrate depends greatly on film thickness and is enhanced as compared to that achieved with their bulk counterpart [2]. The change of chemical reactivity of ultrathin MgO film depending on the film thickness can be explained by the strengthening of the interaction between the oxide and metal interface layers. This result implies that the artificial manipulation of the local structure at the oxide-metal interface is expected to play a pivotal role in controlling the catalytic activity of oxide film. As a preliminary study, we also reported that water dissociation on three model systems with defects at the oxide-metal interface of the 2-ML MgO/Ag(100) - an O vacancy, an Mg impurity, or an O impurity - can improve the chemical reactivity of ultrathin MgO film supported by Ag(100) substrate using periodic DFT calculations [3]. Based on our previous results, we performed the systematic computational study on controlling the chemical reactivity of ultrathin MgO film grown on Ag(100) substrate for the dissociation of individual water molecules by 3d transition metal (TM) interface dopants (Fig. 1) [4].

To investigate the influence of interface dopant on the chemical reactivity of ultrathin oxide film for the dissociation of water molecules, we examined the dissociation mechanism of individual water molecules adsorbed upon a MgO film surface with a dopant as shown in Fig. 1. Figure 2 shows the variation of the reaction energies, such as $E(A)$, $E(D)$ and E_a , during the dissociation of individual water molecules on

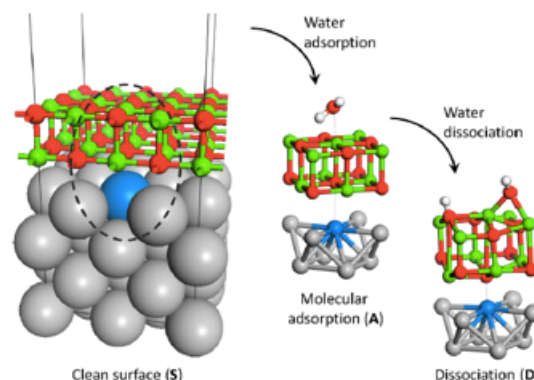


Fig. 1. Dissociation of water molecules on ultrathin MgO film grown on Ag(100) substrate with interface dopants of first row 3d transition metal (TM). (Ag, gray; 3d TM dopant, blue; Mg, green; O, red; H, white).

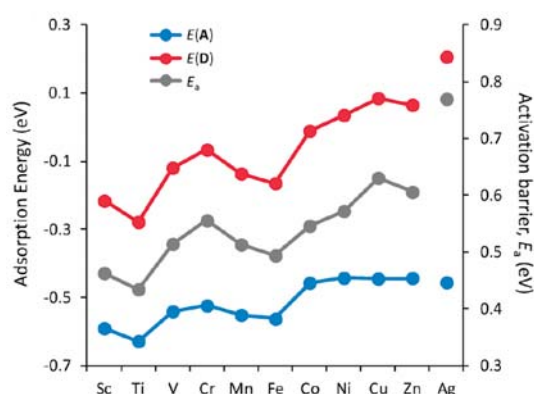


Fig. 2. The variations of $E(A)$, $E(D)$ and E_a along the 3d TM (Sc ~ Zn) dopants.

MgO/Ag(100) according to the kind of interface dopant (Sc ~ Zn). Interestingly, the shape of reaction energy variation along 3d TM series clearly shows a “double-humped pattern” which is usually observed in organometallic systems explained by ligand field stabilization energy with weak field ligands. Although the nature of the interfacial interaction between oxide film and a metal substrate cannot be easily described by a single term, we show that the chemical reactivity of an ultrathin oxide film supported by a doped-metal substrate can be mainly governed by the hybridization between the electronic states of a D_{TM} and an O_i (of oxide layer) at the interface. For systematic study on the influence of dopants upon the electronic structure at the oxide-metal interface, the projected density of states (PDOS) diagrams of $3d_{z^2}(D_{TM})$ and $2p_z(O_i)$ states for the all doped MgO/Ag(100) systems are illustrated in Figs. 3a and 3b, respectively. The distribution of electronic states for bonding and anti-bonding states is depicted by dotted blue and red circles, respectively, on the PDOS diagram of $2p_z(O_i)$ states. The identical alignment of the bonding states (about $-7 \sim -3$ eV) between a D_{TM} and an O_i in PDOS diagrams indicates the existence of orbital interaction along the z-axis at the interface. Hybridization, i.e., the formation of bonding and anti-bonding states, between the electronic states of D_{TM} and O_i indicates that ultrathin MgO film behaves as a ligand for the interface dopants. Our results revealed that the chemical reactivity of the oxide film surface is strongly dependent on the tailored electronic structure caused by the interface dopants at the impurity level, which implies that chemical reactivity can be controlled by adjusting adhesion strength using interface dopants. Therefore, the durability of the developed system and the fine-tuning of its chemical reactivity can be achieved without serious perturbation in the reaction mechanism. In addition, the variation of adhesion energy depending on the kind of dopant originates from hybridization between the electronic states of the interface dopants (D_{TM}) and interface oxygen (O_i), i.e., TM-ligand interaction, which can be described by traditional ligand field theory (LFT).

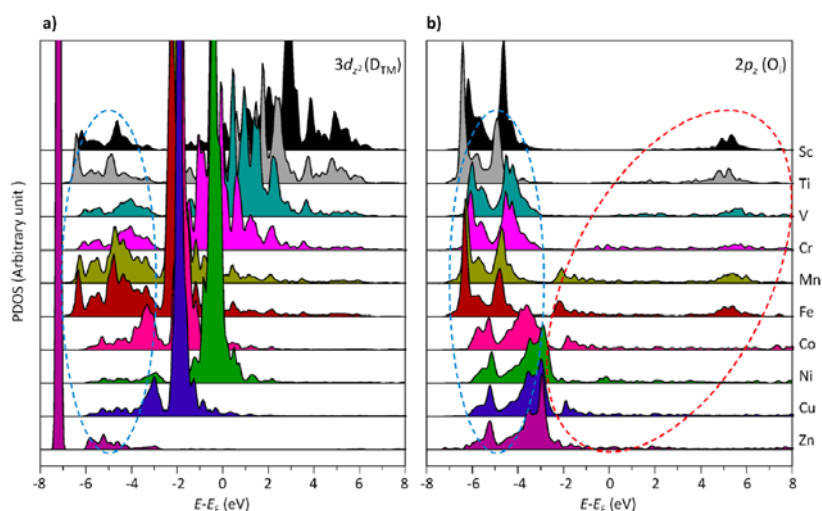


Fig. 3. PDOS of 3d TM (D_{TM}) doped MgO/Ag(100) (*int- M_{dop}* , $M = \text{Sc} \sim \text{Zn}$) before the adsorption of water molecule (**S**); z-components of (a) D_{TM} 3d and (b) O_i 2p. Bonding and anti-bonding states are depicted in (a) and (b) with blue and red dotted lines, respectively.

[Reference]

- [1] H.-J. Freund, *Chem. Eur. J.* **16**, 9384 (2010)
- [2] H.-J. Shin, J. Jung, K. Motobayashi, S. Yanagisawa, Y. Morikawa, Y. Kim, and M. Kawai, *Nat. Mater.* **9**, 442 (2010); J. Jung, H.-J. Shin, Y. Kim, and M. Kawai, *Phys. Rev. B* **82**, 085413 (2010).
- [3] J. Jung, H.-J. Shin, Y. Kim, and M. Kawai, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 6142 (2011).
- [4] J. Jung, H.-J. Shin, Y. Kim, and M. Kawai, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 10554 (2012).

CO on Pt(111) : Overlayer structure and intermolecular interaction

studied by Scanning Tunneling Microscopy

Hyunjin Yang^{1,2}, Maki Kawai², Yousoo Kim¹

Surface and Interface Science Laboratory, RIKEN¹,
Department of Advanced Materials Science, The University of Tokyo²

Carbon monoxide (CO) on a platinum (Pt) surface is one of the most extensively studied systems in the field of surface science, for both practical importance in heterogeneous catalysis and the fundamental understanding of elementary processes at surfaces.¹ Among all the known information for CO adsorbed on Pt(111) surface, it is well known that (a) for the adsorption site of CO, the atop site of substrate Pt atom is primarily occupied up to certain coverage, and (b) for the ordered overlayer structure, atop-dominant $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ structures appear up to coverage of ~ 0.3 ML, and atop-bridge mixed $c(4 \times 2)$ appears at higher coverage (Figure 1).^{2,3} However the detailed overlayer structures at the intermediate coverages and the correlation between overlayer structures and the intermolecular interaction have not been well understood. By means of scanning tunneling microscopy, we tried to provide the real space observation of CO on Pt(111) at various surface coverage, to provide more precise information about the overlayer structure and intermolecular interaction.

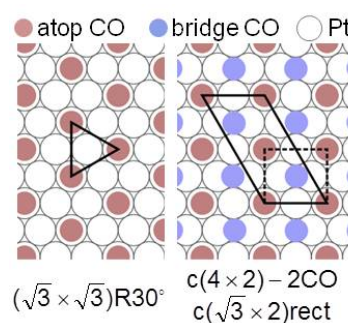


Figure 1 Known overlayer geometry of CO on Pt(111)

All the experiments were performed using a low-temperature scanning tunneling microscope (Omicron GmbH) in an ultra-high vacuum (UHV) chamber ($P_{\text{Base}} 2.0 \times 10^{-11}$ Torr). A Pt(111) single crystal cleaned with typical annealing-sputtering cycle was exposed to CO gas at ~ 50 K followed by room temperature annealing, and observed with STM using electrochemically etched tungsten tip at 4.7 K.

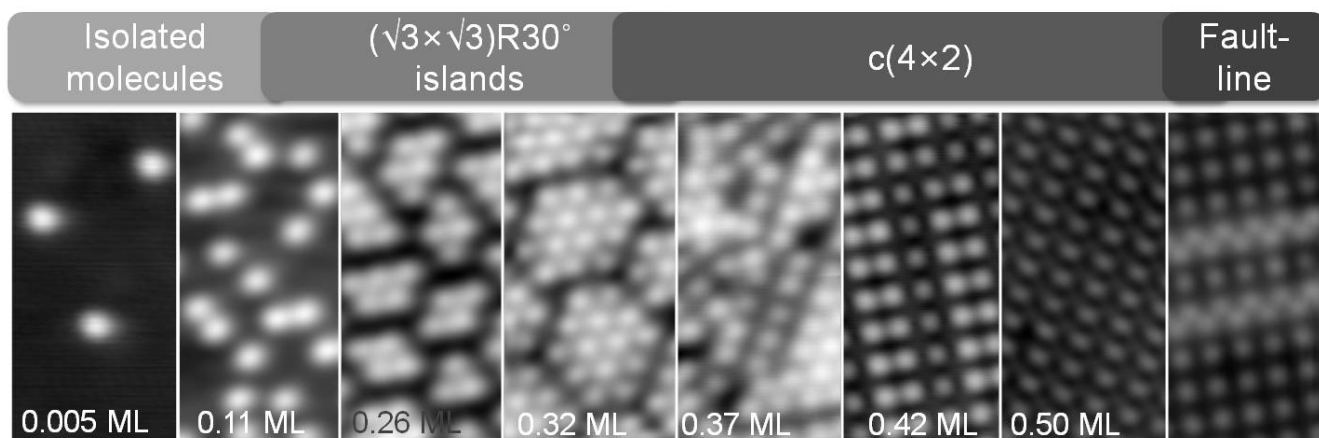


Figure 2 Evolution of overlayer structures from 0.005 ML to 0.56 ML

As Figure 2 shows, the adsorption geometry and the formation of overlayer structures were observed in molecular resolution from coverage of 0.005 ML to approximately 0.56 ML, including $(\sqrt{3}\times\sqrt{3})R30^\circ$ islands, $c(4\times 2)$ domain, and so-called 'fault-line structure' with 1×1 boundary in $c(4\times 2)$ domain. At the low coverage limit (~ 0.005 ML), all the molecules are randomly scattered. From approximately 0.15 ML of surface coverage, island structures with local $(\sqrt{3}\times\sqrt{3})R30^\circ$ geometry appears and the inter-island structure exhibit an anti-phase boundary. Near 0.3 ML, $(\sqrt{3}\times\sqrt{3})R30^\circ$ islands form $2r_0$ (r_0 as inter-atomic distance of Pt substrate), resulting in $c(\sqrt{3}\times 2)$ rect local structure and concomitant incorporation of bridge CO inside the rectangular units. The phase transition from hexagonal phase ($(\sqrt{3}\times\sqrt{3})R30^\circ$ islands) to a $c(4\times 2)$ rectangular lattice involves the widening of the $c(\sqrt{3}\times 2)$ rect boundary and compressing the island region, at the surface coverage of 0.37 ML. The resultant $c(4\times 2)$ domain is well ordered over whole surface with bridge-CO vacancies. The number of bridge-CO vacancies systematically decreases to form complete $c(4\times 2)$ domain at 0.5 ML of surface coverage, and further adsorption involves the formation of 1×1 boundary inside $c(4\times 2)$ domain.

Interestingly, bridge-vacant $c(4\times 2)$ domain exhibit height modulation of atop CO by the number of adjacent bridge CO as shown in Figure 3, indicating the existence of inter-adsorbate interactions between the atop and bridge CO. As the origin of the height modulation of atop CO, two explanation were provided; (1) local charge re-distribution between atop and bridge CO due to different directions of charge transfer^{4,5}, and (2) electrostatic interaction between two opposite dipole, where atop and bridge CO have opposite direction of dipole.⁶

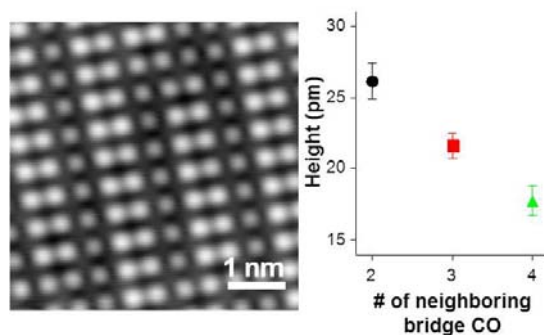


Figure 3 A STM image of bridge-vacant $c(4\times 2)$ domain and the correlation of atop height and number of neighboring bridge CO

The STM observation according to the surface coverage clearly shows the evolution of overlayer structures, including the overlayer structures which have not been observed. Also the quantitative analysis of bridge-vacant $c(4\times 2)$ domain suggests the existence of inter-adsorbate interaction between atop and bridge CO, to provide an explanation for co-existence of different adsorption species and consequent inter-adsorbate interaction.

[References]

- ¹ G. Ertl, *Reactions at Solid Surfaces*, 2nd ed. (Wiley, 2009).
- ² H. Steininger, S. Lehwald, and H. Ibach, *Surf. Sci.* **123**, 264 (1982).
- ³ M. Tüshaus, E. Schweizer, P. Hollins, and A.M. Bradshaw, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **44**, 305 (1987).
- ⁴ P.R. Norton, J.W. Goodale, and E.B. Selkirk, *Surf. Sci.* **83**, 189 (1979).
- ⁵ G. Ertl, M. Neumann, and K.M. Streit, *Surf. Sci.* **64**, 393 (1977).
- ⁶ P. Deshlahra, J. Conway, E.E. Wolf, and W.F. Schneider, *Langmuir* **28**, 8408 (2012).

ミオグロビン活性中心に対するHaldane-Anderson模型の導出とそれを用いた鉄ポリフィリン環の電子状態解析

白川知功¹, Vivien Badaut¹, 柚木清司¹

理研・柚木計算物性物理¹

遷移金属を含む金属タンパク質の様々な機能出現メカニズムの解明において、遷移金属を含む活性中心の局所電子状態の理解が重要であると考えられている。例えば、最も簡単な遷移金属タンパク質であるミオグロビンは筋肉中で酸素分子を貯蔵するタンパク質であるが、酸素分子は活性中心にある鉄原子と化学結合することによりその機能を果たす（図1）。従って、活性中心での遷移金属を含む局所電子状態の正しい理解は、機能出現のミクロなメカニズム解明において重要な意味を持つ。しかしながら、遷移金属イオンのスピン多重項状態を含めた3d電子状態の高精度な理論的計算手法は、強い電子間相互作用の取扱いの困難さ故に未だに確立されていない。

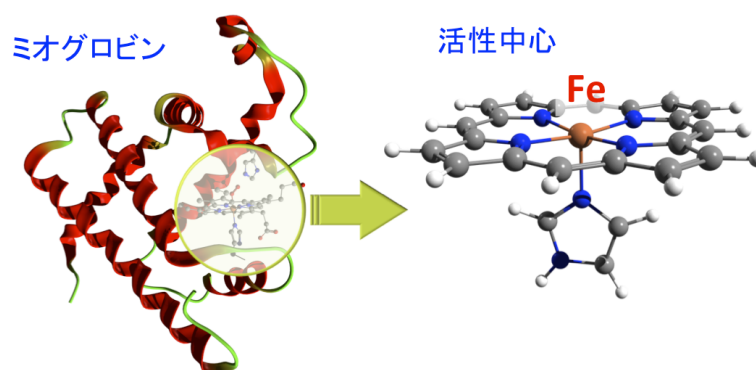


図1. ミオグロビンの活性中心（鉄ポリフィリン環）

我々は、このような困難を解決するため新しい理論的計算手法の開発を物性物理学のバックグラウンドをもとに行っている。もちろん、これまでに多くの計算手法開発が試みられているが、これらはほぼ全て密度汎関数法等をベースにした量子化学計算手法の開発あるいは改良であった。我々は、近年急速に発展してきた密度行列繰り込み群法等の物性物理学的手法を用いることにより、この困難を解決したいと考えている。

今年度は、まず、鉄ポリフィリン環（図1）の有効模型（Haldane-Anderson 模型）を導出する手法を確立した（図2）[1]。まず、①鉄ポリフェリン環の構造を与へ、交換相関汎関数として hybrid GGA を用いた Kohn-Sham 方程式を、GAUSSIAN を用いて計算する。次に、②この計算によりフォック行列と重なり積分を求める。最後に、③直行基底を導出するために、鉄の3d軌道を保ったままでブロック型グラムシュミット変換を行う。こうして、活性中心に対する Haldane-Anderson 模型の一体部分のパラメータが導出される。原理的には、鉄の3d電子間相互作用も第一原理計算的に決定できるが、今回はパラメータとして扱うことにした。

得られた Haldane-Anderson 模型を密度行列繰り込み群法等の物性物理学的計算手法で解析する前に、まず、基底状態の相図を3d電子間クーロン相互作用の関数として計算した[1]。図3は鉄原子の下にイミダゾールが結合した場合の平均場近似で得られた基底状態相図を示す。この結果を見ると、クーロン相互作用を変えることにより、鉄イオンのスピン状態 S が0から1および2の状態が実現していることが分かる。実験的には $S=2$ であることが知られており、得られた相図（図3）を見ると、この $S=2$ 状態が出現するために3d電子間相互作用が本質的であること

が分かる。

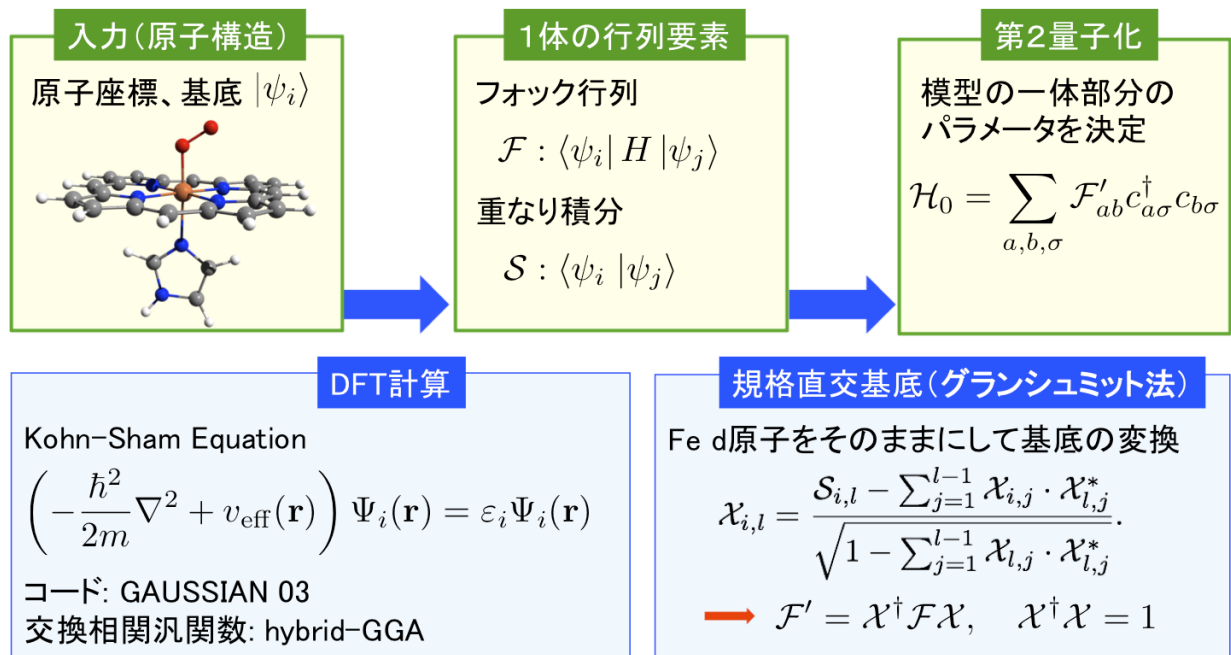


図2. 遷移金属タンパク質の活性中心に対する一体部分の模型パラメーターを導出する方法(概略図)。

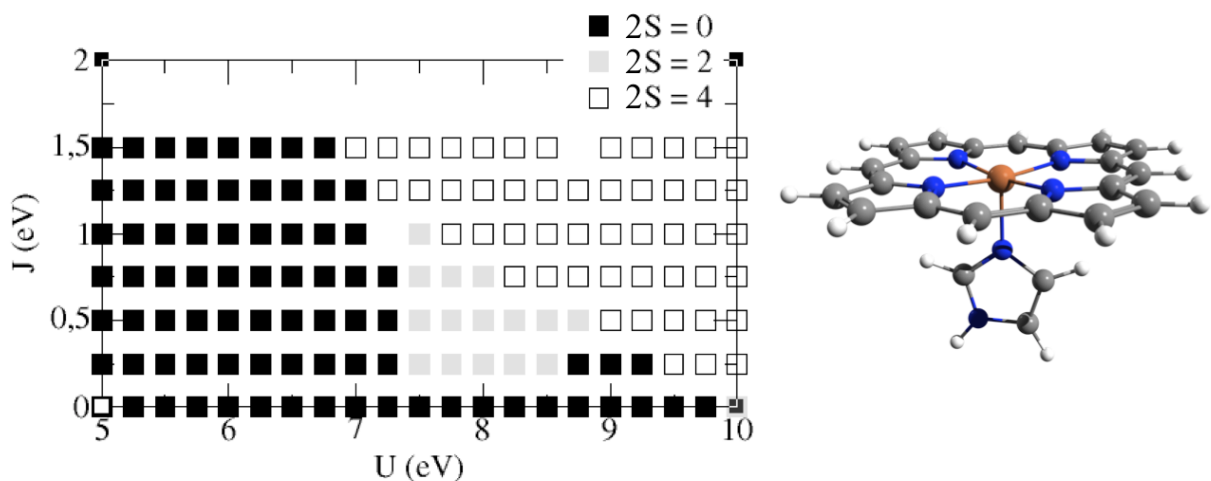


図3. 平均場近似により計算した Haldane-Anderson 模型に対する基底状態相図。ここで、U は 3d 電子間クーロン斥力、J は 3d 電子間フント結合。

最後に、我々は、鉄の 3d 電子間相互作用を近似無く正しく扱うために、Haldane-Anderson 模型に対する密度行列繰り込み群法を新しく開発した。その応用として、今年度は、最も簡単な場合であるグラフェンにおける近藤問題に適用した。我々の開発した密度行列繰り込み群法を用いることにより、例えば、磁性不純物周りのスピン状態の実空間分布がはじめてシミュレーションできるようになった。この手法を用いれば、例えば、遷移金属の周りの活性中心でのスピン状態分布も計算可能となり、活性中心の局所電子状態解明に非常に強力な計算手法になると期待している。

【参考文献】

[1] Badaut, V.; Shirakawa, T.; and Yunoki, S.: *J. Phys.: Conf. Ser.* **2012**, 400, 032006.