

分子システム解析チーム

(チームリーダー：田原 太平)

二次元蛍光寿命相関分光法を用いた プロテインA-Bドメインの折り畳み自由エネルギー地形の研究

乙須拓洋¹, 石井邦彦¹, 小井川浩之², 新井宗仁³, 高橋聡², 田原太平¹

理研・田原分子分光¹, 東北大・多元研², 東大院・総合文化³

100残基以下の単一ドメイン球状タンパク質の折り畳み過程は通常、安定な中間状態を経由しない2状態モデルで説明される。しかし近年では、下り坂型の折り畳み過程や変性状態の構造不均一性など、単純な2状態モデルを超えた折り畳み自由エネルギー地形の記述が試みられている[1]。自由エネルギー地形を実験的に詳細に調べるためには、折り畳み過程に現れる各状態を高い時間・構造分解能で観測する必要がある。我々は近年、二次元蛍光寿命相関分光法(2D-FLCS [2])を開発し、シトクロムcの折り畳み過程に現れる複数の中間状態をマイクロ秒の時間分解能で観測できることを示した[3]。本研究では、小タンパク質の折り畳み過程の研究に2D-FLCSを応用するため、プロテインA-Bドメイン(B domain of protein A: BdpA, 図1)を対象とした実験を行った[4]。

BdpAは3ヘリックスバンドル構造を持つ60残基のタンパク質であり、非変性条件下で非常に速い($\sim 10 \mu\text{s}$)折り畳みを示すことから、実験・理論の両面で多くの研究が行われてきた。BdpAのバッファー溶液に変性剤としてグアニジン塩酸塩(guanidinium chloride)を加えると、変性状態の自由エネルギーが低下して折り畳み速度が遅くなり、変性状態と天然状態が平衡条件で共存するようになる。この条件で2D-FLCSを用いた測定を行った結果、図2aに示すような二次元蛍光寿命相関マップが得られた。ここで用いた試料は図1のA, Cの位置にFRET対をなす蛍光色素標識(ドナー: Alexa488、アクセプター: ATTO633)を導入したものであり、観測された蛍光寿命はドナーからアクセプターへのエネルギー移動効率を通してBdpAの構造変化を反映する。この二次元マップは図2bに示す2つの異なる蛍光寿命分布をもつ成分の自己相関の和で表され、各成分は変性剤濃度依存性から天然状態(sp1)と変性状態(sp2)に帰属された。sp1は多峰性の分布を示しており、天然状態における構造不均一性の存在が示唆される。この多峰性分布の形状は変性剤濃度に依存して変化した。また、相関遅延時間依存性の解析から、天然状態と変性状態の間の相互変換には $500 \mu\text{s}$ 以上かかる一方、sp1の構造不均一性は $10 \mu\text{s}$ 以内に緩和してい

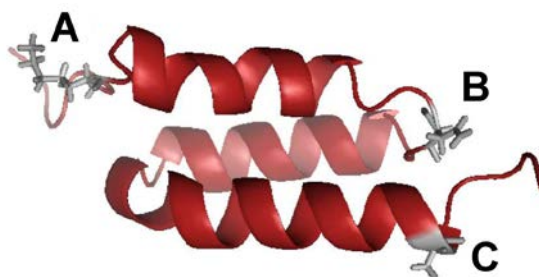


図1. BdpAの構造と蛍光標識位置。

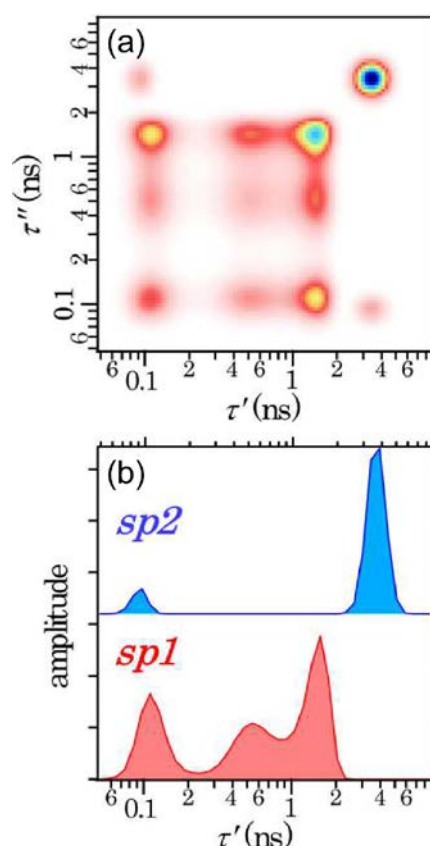


図2. A,C標識試料の2D-FLCS測定結果(相関遅延時間1~20 μs)。

ることが分かった。つまり、BdpAの折り畳み自由エネルギー地形には2状態モデルが良く当てはまるが、その「天然状態」が実際には単一の構造ではなく、変性条件を反映して揺らいでいることが明らかになった。この「天然状態」内の構造揺らぎは、3本のヘリックスの一部が解離する構造変化に対応すると考えられる。

一方、sp2の蛍光寿命分布のピーク位置はエネルギー移動効率がほぼゼロであることを表しており、変性状態については色素間距離が遠すぎて構造不均一性が十分反映されていない可能性がある。そこで、蛍光ラベル位置をB, Cに変えた試料（ドナー：Alexa488、アクセプター：Alexa633）を用いた測定を行った（図3）。その結果、多峰性の蛍光寿命分布を示す変性状態(sp1')とアクセプターを欠くBdpA分子(sp2')に帰属される成分が観測された（図3b）。sp1'の分布の形状も変性剤濃度依存性を示し、変性状態においても変性条件を反映する速い構造揺らぎが存在することが分かった。これは変性状態のタンパク質が一般的にランダムコイル状の高分子として振舞い、変性剤濃度に依存する空間的な広がりを持ちながら拡散的に構造変化するという描像と一致するほか、部分的なヘリックスの形成／解離を伴っている可能性もある。

以上のように、2D-FLCSを応用することで小タンパク質の折り畳み自由エネルギー地形をより詳細に調べられるようになった。今後は折り畳み遷移状態の観測[5]など、2D-FLCSの高い時間分解能を生かした計測に挑戦していきたい。

【参考文献】

- [1] Takahashi, S.; Kamagata, K.; Oikawa, H. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, 36, 1.
- [2] Ishii, K.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 11414 & 11423.
- [3] Otsu, T.; Ishii, K.; Tahara, T. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 7685.
- [4] Otsu, T.; Ishii, K.; Oikawa, H.; Arai, M.; Takahashi, S.; Tahara, T. *Biophys. J.* **2015**, 108, 501a.
- [5] Chung, H. S.; McHale, K.; Louis, J. M.; Eaton, W. A. *Science* **2012**, 335, 981.

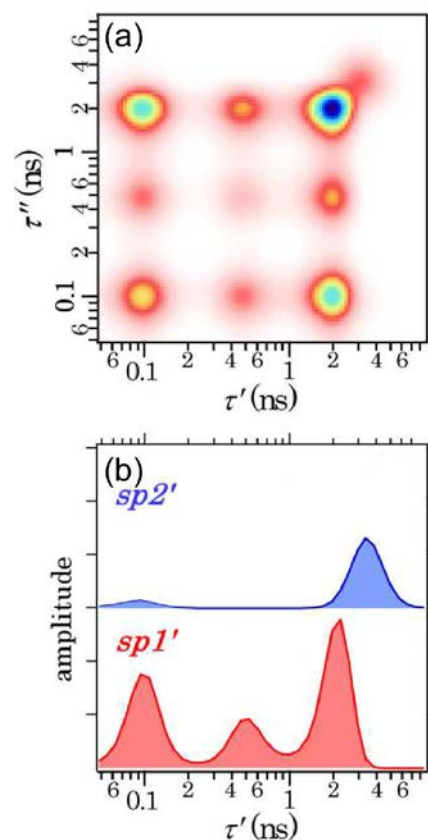


図3. B,C 標識試料の2D-FLCS 測定結果(相関遅延時間 1~20 μ s)。

二次元蛍光寿命相関分光法を用いた ヘアピンRNA/DNAの構造変化ダイナミクスの研究

Chao-Han Cheng, 石井邦彦, 田原太平

理研・田原分子分光

核酸の高分子としての物理的性質、特にそのダイナミクスは核酸が生体内で発現する機能に密接に関連しており、これを詳細に明らかにすることは基本的に重要である。二種類の核酸、すなわちRNAとDNAは化学的に非常に類似しているにもかかわらず、生体内で担う機能が大きく異なっている。そこでこれらの核酸の物理的性質の違いを、化学的起源と生物学的意義に関連させながら明らかにすることに興味を持たれる。

本研究では、我々が最近開発した2D-FLCS法[1]を応用して、ヘアピン構造を取る一本鎖核酸分子（図1）の構造形成・解離ダイナミクスを調べた[2]。同等の塩基配列をもつRNAとDNAを比較することで、塩基配列依存性を排した性質の違いを明らかにすることを目標とした。ヘアピン構造の形成速度(k_{close})と解離速度(k_{open})を求めることで、それぞれ一本鎖の柔軟性と二本鎖の安定性の知見が得られると期待される。

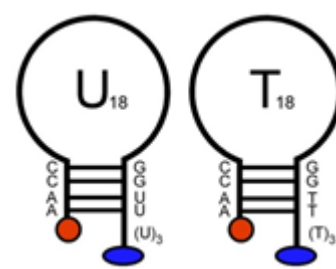


図1. ヘアピン構造を取るRNA（左）とDNA（右）。

これらの速度を末端に標識した蛍光色素間のFRET効率の変化を通して高精度に決定するため、従来の2D-FLCS法を拡張して2波長同時蛍光検出を行う構成に変更した。FRET対のドナー／アクセプター蛍光光子を時間相関光子計数装置を用いて計測し、得られた光子時系列データを元に拡張二次元蛍光相関マップを構築した[3]。この二次元マップのドナー蛍光減衰曲線部分に最大エントロピー法に基づく逆ラプラス変換を適用することで、試料の各状態に対応する蛍光寿命分布およびアクセプター蛍光強度を得た（図2）。その結果、アクセプターを欠く分子(sp1)・ヘアピン解離構造(sp2: “open”)・ヘアピン構造(sp3: “closed”)に帰属される3つの独立成分が観測された。この成分数と各成分の蛍光寿命分布にはRNAとDNAの間で顕著な違いが見られなかった。これらのことから、測定に用いた核酸分子のヘアピン形成ダイナミクスは“closed”, “open”の単純な2状態モデルで表されることが確かめられた。

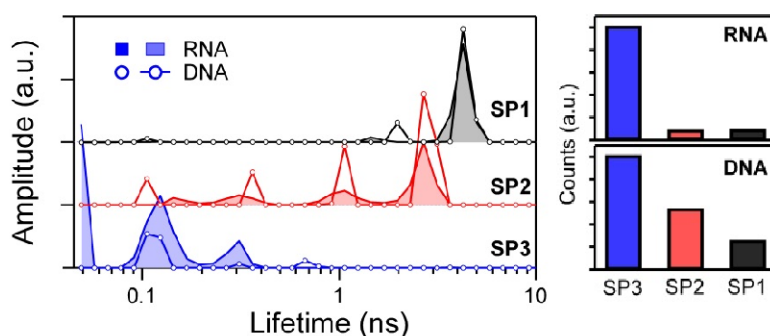


図2. 3成分の蛍光寿命分布（左）とアクセプター強度（右）。

得られた各成分の蛍光寿命分布とドナー／アクセプター強度比を元に、filtered FCS[4]と呼ばれる解析法を用いて各状態の自己相関関数と状態間の相互相関関数を求めた（図3）。“closed”状態と“open”状態の自己相関関数と相互相関関数は、2状態近似の元では以下の式で表される。

$$G^{C,C}(\Delta T) = 1 + \frac{1}{N} g_D(\Delta T) \left\{ 1 + \frac{k_{\text{open}}}{k_{\text{close}}} \exp \left[- (k_{\text{close}} + k_{\text{open}}) \Delta T \right] \right\},$$

$$G^{O,O}(\Delta T) = 1 + \frac{1}{N} g_D(\Delta T) \left\{ 1 + \frac{k_{\text{close}}}{k_{\text{open}}} \exp \left[- (k_{\text{close}} + k_{\text{open}}) \Delta T \right] \right\},$$

$$G^{C,O}(\Delta T) = 1 + \frac{1}{N} g_D(\Delta T) \left\{ 1 - \exp \left[- (k_{\text{close}} + k_{\text{open}}) \Delta T \right] \right\}.$$

N は観測領域に存在する平均分子数、 $g_D(\Delta T)$ は分子の並進拡散を表す相関関数（状態により変化しないと仮定した）である。この式を用いて観測された相関関数をグローバルフィッティング解析することで、 k_{close} と k_{open} を決定した（表1）。その結果、ヘアピン構造形成速度にはRNAとDNAの間で大きな差がないのに対し、解離速度は10倍以上異なることが分かった。

以上の結果は、RNAとDNAの二本鎖部分の構造安定性が大きく異なることを示唆する。生理的条件下でのDNAの熱力学的に安定な二本鎖構造はB型であるが、RNAは2'-OH基の立体障害のためB型を取れず、A型で存在する。しかし、二本鎖の安定性はRNAの方が高いことが知られている。これはRNAの2'-OH基が水の水素結合ネットワークに参加することによる付加的な安定化が寄与していると考えられている。今回の結果は、4塩基対の短い二本鎖のマイクロ秒オーダーのダイナミクスにおいても、この安定化の機構が働いていることを示唆している。

一方で、今回の結果ではヘアピン構造形成速度(k_{close})に差が見られなかったが、一本鎖の高分子物性がRNAとDNAで異なる例も報告されていることから、今後 k_{close} の温度依存性[5]を測定することで一本鎖のダイナミクスについてより詳しく調べていく。

【参考文献】

- [1] Ishii, K.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 11414 & 11423.
- [2] Chao-Han Cheng・石井邦彦・田原太平, 第8回分子科学討論会, **2014**, 3A14.
- [3] 石井邦彦・Chao-Han Cheng・田原太平, 第8回分子科学討論会, **2013**, 2D20.
- [4] Felekyan, S. et al. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 1036.
- [5] Chao-Han Cheng・石井邦彦・田原太平, 第53回日本生物物理学会年会, **2015**, 2O1530.

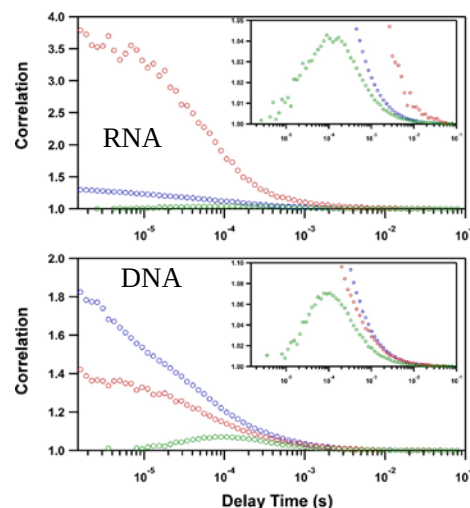


図3. 赤、青：それぞれ“open”、“close”構造の自己相関関数。緑：それらの相互相関関数。

表1. グローバル解析により得られたヘアピン構造形成／解離速度定数。

	$k_{\text{close}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{open}} / \text{s}^{-1}$
RNA	3650 ± 290	365 ± 30
DNA	3600 ± 110	5600 ± 510

気水界面の精密な $\chi^{(2)}$ スペクトルの決定

二本柳聡史¹, 日下良二¹, 井上賢一¹, Aniruddha Adhikari¹, 山口祥一^{1,2}, 田原太平¹

理研・田原分子分光¹, 埼玉大院・理工²

空気/水界面は最も基本的な液体界面であり、これまでに二次非線形分光の一種である振動和周波発生分光法による実験とその理論的解析を中心に精力的に研究されてきた。従来型の振動和周波発生(VSFG)分光を用いた研究によって水界面には水素結合していない水のOHと水素結合したOHが両方存在することがわかっている。しかしながら従来法では光の強度のみを検出するため、実験的に得られる量は非線形感受率の二乗 ($|\chi^{(2)}|^2$) に留まってしまう。そのため $\chi^{(2)}$ の位相情報は失われてしまい、得られたスペクトルを詳細に議論することは困難である。

この問題を克服するために干渉を利用して複素 $\chi^{(2)}$ スペクトルそのものを実験的に決定する方法が開発された。Shenらがまず波長を走査しながら各波長で位相を測定する位相敏感VSFG

(PS-VSFG) 法[1]を考案し、我々のグループは帯域の広い赤外入射光とマルチプレックス検出を用いて非線形信号の振幅と位相を一度に決定するヘテロダイン検出VSFG (HD-VSFG) 法[2]を開発した。そしてShenらはPS-VSFG法を用いて 2008 年に初めて空気/水界面の $\chi^{(2)}$ スペクトルを発表し[1]、吸収スペクトルに対応するその虚部 ($\text{Im } \chi^{(2)}$) のスペクトルには 3240 cm^{-1} 以下に正のバンド、3400 cm^{-1} 付近に負のバンド、そして 3700 cm^{-1} 付近に正の水素結合していないFree OHバンドが現れることを報告した。2009 年に

我々のグループはHD-VSFG法を用いて空気/水界面を測定し、Shenの報告と本質的に同じスペクトルを得た[2]。しかしながら 2011 年にわれわれが行なった位相精度を高めた測定では、スペクトルは三つのバンドを示すものの、低波数の正のバンドが著しく小さく現れていた[3]。この低波数領域の正のバンドは空気/水界面の水素結合構造を議論する上で本質的に重要である。今回、我々はHD-VSFG分光法の測定、校正方法を改良・再検討し、現時点で最も信頼のできる空気/水界面 $\chi^{(2)}$ スペクトルを決定した[4]。

主な改良点は次の通りである：①赤外光の中心波長をスキャンすることにより、広い波数領域で良好な信号ノイズ比を実現した。②非共鳴な液体である重水およびパーフルオロノナンを測定し、それまで位相校正に用いていた水晶からの信号

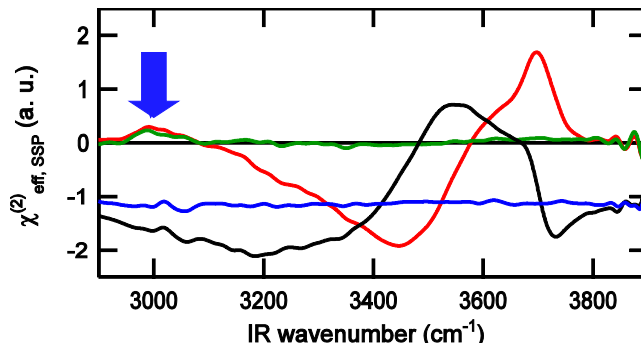


図 1. 水晶で規格化した空気/水界面の $\chi^{(2)}$ スペクトル (赤線：虚部、黒線：実部) と空気/重水界面の $\chi^{(2)}$ スペクトル (緑線：虚部、青線：実部)。問題のバンドを青の矢印で示している。

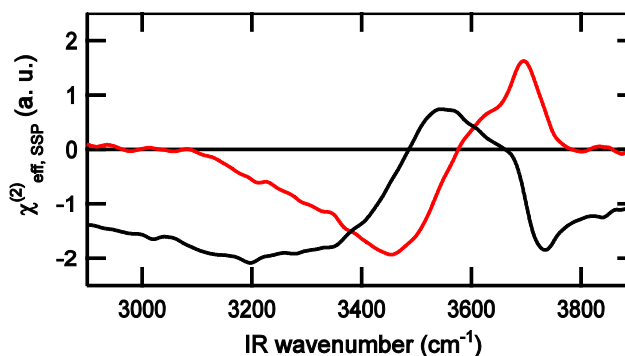


図 2. 重水で規格化した空気/水界面の $\chi^{(2)}$ スペクトル (赤線：虚部、黒線：実部)

の信頼性を検証した。これにより、これまでの結果を覆す重要な事実が見つかった。以下に詳細を述べる。

図1に水晶で規格化した空気／水界面の $\chi^{(2)}$ スペクトルを示す。このスペクトルの虚部（赤線）は2011年に我々が報告したスペクトルによく似ており、青矢印で示すように3000 cm^{-1} にわずかな正のバンドが見える。ところが、重水のスペクトルの虚部（緑線）も非常によく似た正のバンドを示している。このため、軽水のスペクトルを重水のそれで規格化すると、図2に示すように、低波数の正のバンドは誤差の範囲で完全に消失する。また、このスペクトルにおいては3800から3850 cm^{-1} の非共鳴な波数領域の位相が $179^\circ \pm 1^\circ$ になることを確認した。一方、水晶で規格化した軽水のスペクトル（図1）に対して同じ波数領域の位相を求めると $177^\circ \pm 6^\circ$ となり、重水で規格化したスペクトルの方が繰り返し精度においても大きく改善していることが分かった。

さらに、図3に示すように、別の非共鳴液体であるパーフルオロノナンのスペクトルを重水のスペクトルで規格化すると純実数になる。このことから、重水とパーフルオロノナンはともに完全に非共鳴であることが実験的に確認された。一方、水晶で規格化した重水のスペクトルは水晶を洗浄することでより実数に近づくことがわかった（図4）。これらの結果から重水で規格化したスペクトル（図2）が現時点で最も精度の高いスペクトルであり、3100 cm^{-1} 以下の領域には実験精度の範囲では正のバンドは観測されないことが明らかとなった。

Shenのグループと我々のグループの報告の後、複数のグループから空気／水界面の $\text{Im } \chi^{(2)}$ スペクトルが報告されたが、それらはすべて低波数領域に正のバンドを示していた。このバンドはそれらの測定の位相精度が十分でなかったために現れていたと考えられる。今後この事実に基づいて理論的解釈を再構築する必要がある。

【参考文献】

- [1] N. Ji, V. Ostroverkhov, C. S. Tian, Y. R. Shen, Phys. Rev. Lett., 100 (2008) 096102.
- [2] S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, T. Tahara, J. Chem. Phys., 130 (2009) 204704.
- [3] S. Nihonyanagi, T. Ishiyama, T.-k. Lee, S. Yamaguchi, M. Bonn, A. Morita, T. Tahara, J. Am. Chem. Soc., 133 (2011) 16875-16880.
- [4] S. Nihonyanagi, R. Kusaka, K.-i. Inoue, A. Adhikari, S. Yamaguchi, T. Tahara, J. Chem. Phys. 143 (2015) 124707.

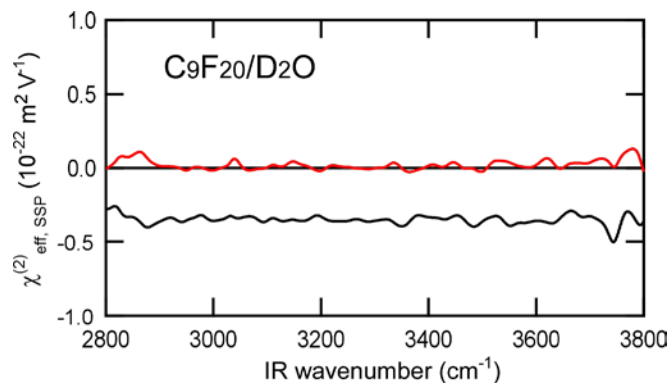


図 3. 重水で規格化した空気／パーフルオロノナン界面の $\chi^{(2)}$ スペクトル（赤線：虚部、黒線：実部）

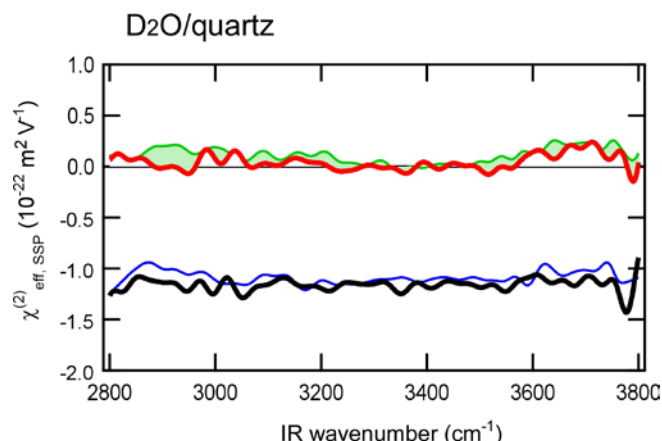


図 4. 洗浄前および洗浄後の水晶で規格化した空気／重水界面の $\chi^{(2)}$ スペクトル（緑線：洗浄前虚部、青線：洗浄前実部、赤線：洗浄後虚部、黒線：洗浄後実部）

Water Structure at the Buried Silica/Aqueous Interface Studied by Heterodyne-Detected Vibrational Sum-Frequency Generation

Anton Myalitsin¹, Shu-hei Urashima¹, Satoshi Nihonyanagi¹, Shoichi Yamaguchi^{1,2}, Tahei Tahara¹

¹Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN, ²Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Saitama University

Buried solid/liquid interfaces are important for many natural and industrial sciences. However, it is difficult to characterize solid/liquid interfaces by conventional spectroscopic methods because they are located between two bulk phases. In fact, the number of molecules at the interface is much less than in the bulk liquid so that the weak signal from the interface is hidden by the bulk signal. Moreover, the buried interface is not accessible by conventional surface science techniques such as electron microscopy.

Vibrational sum frequency generation (VSFG) is forbidden in centrosymmetric media, such as bulk water, under the dipole approximation. This makes VSFG a unique tool for probing interfaces, where symmetry is necessarily broken. Previously, we have developed multiplex heterodyne-detected VSFG (HD-VSFG) that can directly measure the complex $\chi^{(2)}$ ($\chi^{(2)}$: second order nonlinear susceptibility) spectrum over a wide frequency range at once with high signal to noise ratio [1]. The imaginary part of the $\chi^{(2)}$ ($\text{Im}\chi^{(2)}$) spectrum directly represents the vibrational spectrum at the interface and can be easily interpreted in the same manner as bulk IR and/or Raman spectra. Furthermore, the sign of the $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectrum indicates the net orientation of the molecular species at the interface. However, application of HD-VSFG to the buried interface has been prevented by technical difficulties, in particular the lack of a suitable reference. We overcame this limitation, by using the nonresonant signal of the silica/air interface as a reference. In the present study, we investigated the pH dependent water structure at silica/water as a prototypical mineral/water interface [2].

The optical layout of a HD-VSFG spectrometer for buried solid/liquid interfaces is shown in Figure 1. The experiment was carried out using isotopically diluted water (HOD-D₂O). In vibrational spectroscopies, because the H₂O spectrum is more complicated due to inter- and intra-molecular vibrational couplings, the isotopic dilution is often used as an aqueous phase to remove any vibrational couplings.

Figure 2 shows the $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectra of the silica/HOD-D₂O interface at different bulk “pH”. Here pH refers to both hydrogen and deuterium atoms. In the $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectra of the silica/ HOD-D₂O interface at pH=12 (blue line in Fig. 2), a broad OH band is observed at 3400 cm⁻¹. The positive sign of the OH band corresponds to the H-up orientation of interfacial water which directs their hydrogen toward negatively charged silica surface (Figure 3, A).

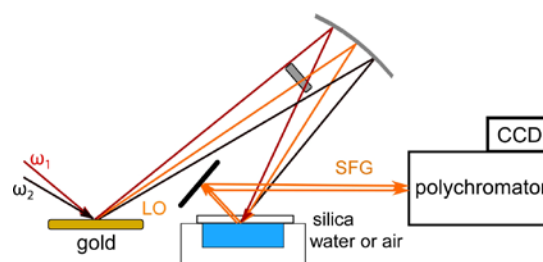


Figure 1. Schematic of the experimental HD-VSFG setup. Broadband infrared (ω_1) and narrow band visible (ω_2) beams are focused on gold mirror to generate local oscillator (LO) at sum-frequency. The reflected ω_1 and ω_2 beams are refocused onto a sample interface, which generate sum frequency light of the sample (silica/water) interface. The SFG and LO lights are introduced into the polychromator to generate interference fringes and finally the interference pattern is detected by a CCD.

Previous studies in which H₂O was used as an aqueous phase reported that the $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectrum of water at SiO₂ surface at high pH exhibits double band feature with peaks at 3200 and 3400 cm⁻¹ [3]. The observations were interpreted as an indication of at least two different water structures, namely ice-like and liquid-like water structures [3]. However, the HOD-D₂O data shown in Figure 2 clearly shows that the positive OH band observed in high pH is essentially one broad continuum and hence the double-band feature previously observed in the H₂O spectra are due to the vibrational coupling.

At pH = 2.1 (black line in Fig. 2), the OH band becomes predominantly negative, centered around 3200 cm⁻¹. This indicates that the majority of interfacial water is in H-down orientation, in which water molecules at the interface direct their hydrogen toward bulk water side. This can be interpreted as the effect of the neutral silanol. At this acidic pH, the surface silanol is expected to be completely neutral and act as hydrogen bond donor. Therefore, interfacial water accepts hydrogen bonds from the surface silanol and donates hydrogen bonds to the other water molecules in the bulk (Figure 3 C). Nevertheless, the higher frequency side of the OH band remains positive, indicating that some portion of interfacial water preserves H-up orientation even at very low pH. This can be attributed to the water which hydrogen bonds to the oxygen of the surface silanol or a bridge oxygen at the surface (Figure 3 B). The negative OH band in the HOD-D₂O spectrum is peaked at 3200 cm⁻¹, showing long tail toward lower frequency side, suggesting the existence of a strong hydrogen bond at this interface.

At pH = 7.2 (red line in Fig. 2), the OH band is in between the spectra at pH = 2.1 and pH = 12.1, showing small negative band and relatively large positive band. This indicates that some fraction of interfacial water molecules is in H-down orientation and majority is in H-up orientation. At neutral pH 7.2, all three types of water species can coexist.

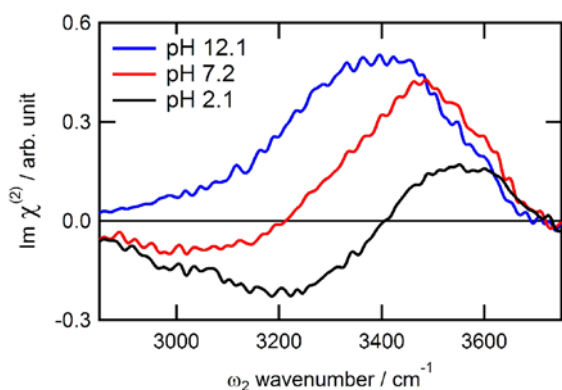


Figure 2. Imaginary part of the $\chi^{(2)}$ spectra of the buried silica/HOD-D₂O interface for different pH in phosphate buffer (I = 10 mM, ratio of H₂O:HOD:D₂O is 1:8:16).

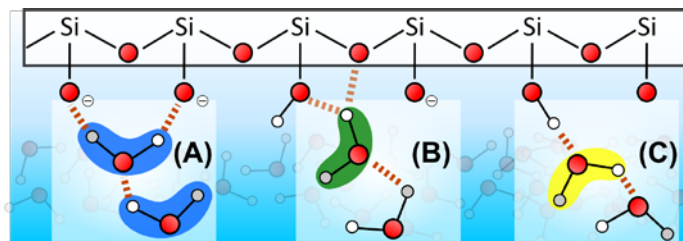


Figure 3. Sketch of the different types of hydrogen bonds at the buried silica/HOD interface that appear at different “pHs”. A: H-up oriented water that is hydrogen-bonded to the negatively charged oxygen atom. B: H-up oriented water H-bonding to the oxygen atom of the silanol or siloxane bridge. C: H-down oriented water that is hydrogen-bonded to the silanol as well as bulk water.

References

- [1] S. Nihonyanagi, J. A. Mondal, S. Yamaguchi, T. Tahara, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 64 (2013) 579-603.
- [2] A. Myalitsin, S.-h. Urashima, S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, T. Tahara, revision to be submitted to *J. Phys. Chem. C*.
- [3] Y. R. Shen, V. Ostroverkhov, *Chem. Rev.*, 106 (2006) 1140-1154.

ヘテロダイン検出電子共鳴および振動共鳴和周波発生分光法による 混合溶媒/空気界面における溶媒極性の研究

Sudip Kumar Mondal¹, 井上賢一¹, 山口祥一^{1,2}, 田原太平¹

¹理研・田原分子分光, ²埼玉大院・理工

二つの溶媒を適切な比で混合すると溶媒の極性や粘性、密度、蒸気圧など様々な物性を任意に変化させることができる。このため混合溶媒は化学合成や再結晶、液体クロマトグラフィなど幅広い応用分野で利用されている。これらの応用はよく知られている混合溶媒のバルク物性に基づいている。しかしながら、純液体の界面物性はバルクのそれとはかなり異なることが我々のこれまでの研究から明らかとなっている。したがって、混合溶媒の界面ではこれまでに全く知られていない特殊な物性を示す可能性がある。本研究では界面選択的な分光法であるヘテロダイン検出電子共鳴和周波発生[1, 2]およびヘテロダイン検出振動和周波発生分光法[3]を駆使し、DEPNA (N,N-diethyl-p-nitroaniline) を極性指示薬として用いて空気/水-DMF 混合液体界面の実効的な溶媒極性について調べた[4]。驚くべきことに、DMF の比率を上げるとバルクの実効極性が減少するのに対して、界面の実効極性は増加することが明らかとなった。この混合溶媒界面の実効極性の異常な振る舞いについて界面の水素結合構造に基づいて議論した。

実験は極性指示薬であるDEPNA (N,N-diethyl-p-nitroaniline)を含む水-DMF混合溶媒で行った。バルクの実効極性は紫外可視吸収スペクトルのピーク波長で評価した。図1に示すようにバルクのピーク波長(青)は純水中の430 nmからDMF比が増加するとともに短波長側にシフトしDMF比0.1では425 nmである。このピーク波長に対応する E_N^T 極性を左軸に示す。明らかにDMF比が増加するとバルクの極性は低下している。これは極性の高い水にそれより極性の低いDMFが加えられることによって全体の極性が下がったことを意味している。一方、ヘテロダイン検出電子共鳴和周波発生から求めた界面のDEPNA分子の共鳴ピーク波長はDMF比の増加とともに長波長シフトを示した(図1赤)。つまり、界面の溶媒極性は、バルク極性と逆に増加したことになる。

表面張力測定から混合溶液の表面はほとんどDMFによって覆われていることが示唆されている。また、ヘテロダイン検出振動和周波発生分光測定からはDMFがメチル基を空気側に、カルボニル基をバルク溶液側に向けて配向していることがわかった。これを基にバルク中と界面におけるDEPNAの溶媒和構造の違いを図2のように考えると、観測された界面の実効極性の奇妙な振る舞いを以下のようにうまく説明できる。

まず、バルク純水中ではDEPNA

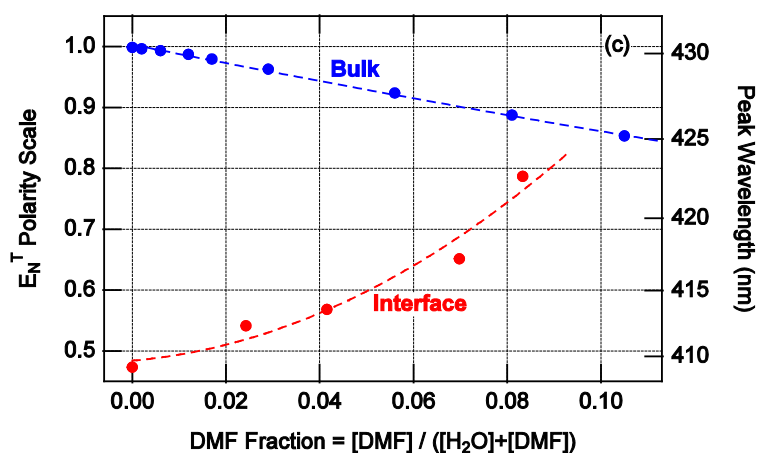


図1. バルク(赤)および界面(青)におけるDEPNAのピーク波長(右軸)とそれに対応する E_N^T 極性(左軸)。

は極性の高い水に取り囲まれ、最大限に溶媒和される。DMF 比が増加すると一部の溶媒和水が比較的極性の低い DMF に置き換わる。このため混合溶媒中の DEPNA の溶媒和による安定化エネルギーは減少する。つまり DEPNA が感じる実効極性が低下する。一方、純水界面においては DEPNA のニトロ基側は水に溶媒和されているがジエチル基側は空気に突き出しており全く溶媒和されていない。よって、界面の DEPNA は下側の半分しか溶媒和されていない。DMF 比が増加して DMF が表面を覆うとむき出しだった DEPNA のジエチル基側が DMF によって溶媒和されるようになる。したがって、界面の DEPNA は DMF が存在している方がより溶媒和される。つまり DEPNA は混合溶媒の界面でより大きく安定化されるため、これが DEPNA の感じる実効極性の増加として観測されたと考えられる。さらに DMF 比が増加して、混合比が 0.1 以上になると DMF が界面を完全に覆い尽くしているため DEPNA は最表面には出てこなくなり、DEPNA の溶媒和構造は基本的にバルク中のそれと同じになる。よって、界面の実効極性はバルクのそれと同じになると考えることができる。

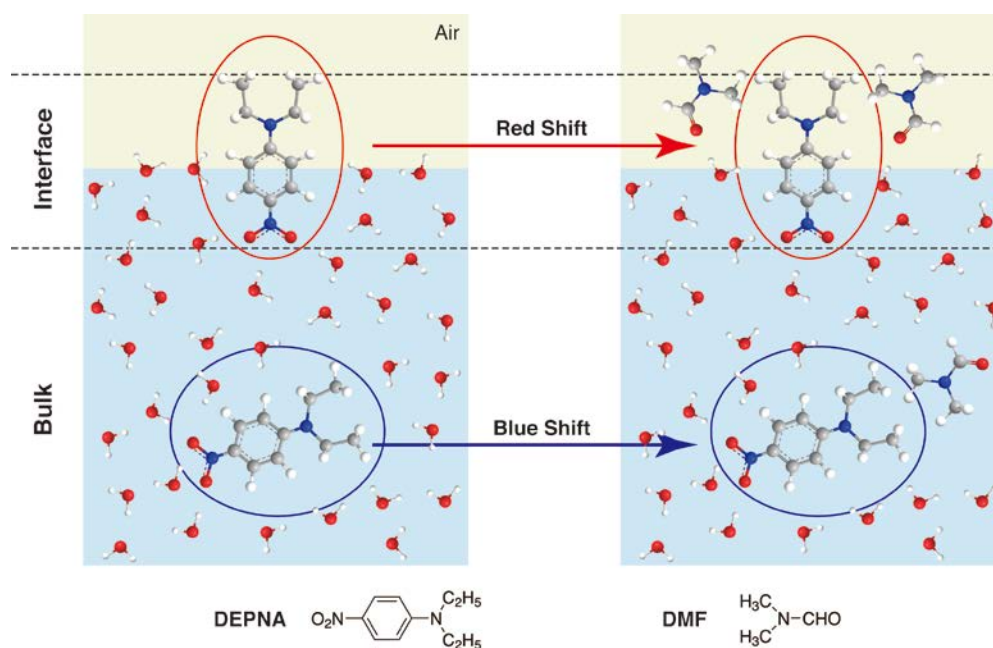


図 2. 純水(左)および水-DMF 混合溶媒(右)のバルクおよび界面における DEPNA の溶媒和構造。下部に DEPNA および DMF の分子構造を示す。図中の赤い球は酸素原子、青い球は窒素原子、灰色の球は炭素原子、白い球は水素原子を表す。DEPNA を囲む青い円はバルクの第一溶媒和層を、赤い円は界面の第一溶媒和層を示す。

【参考文献】

- [1] S. Yamaguchi, T. Tahara, J. Chem. Phys., 129 (2008) 101102.
- [2] S. Yamaguchi, T. Tahara, J. Phys. Chem. C, 119 (2015) 14815-14828.
- [3] S. Nihonyanagi, J. A. Mondal, S. Yamaguchi, T. Tahara, Ann. Rev. Phys. Chem., 64 (2013) 579-603.
- [4] S. K. Mondal, K.-i. Inoue, S. Yamaguchi, T. Tahara, Phys. Chem. Chem. Phys., 17 (2015) 23720-23723.

Ultrafast dynamics of solvatochromic guest encapsulated in an aromatic micelle

Matthew M. Sartin,¹ Kei Kondo,² Satoshi Takeuchi,¹ Michito Yoshizawa,² Tahei Tahara¹

¹Molecular Spectroscopy Lab., RIKEN, ²Tokyo Institute of Technology

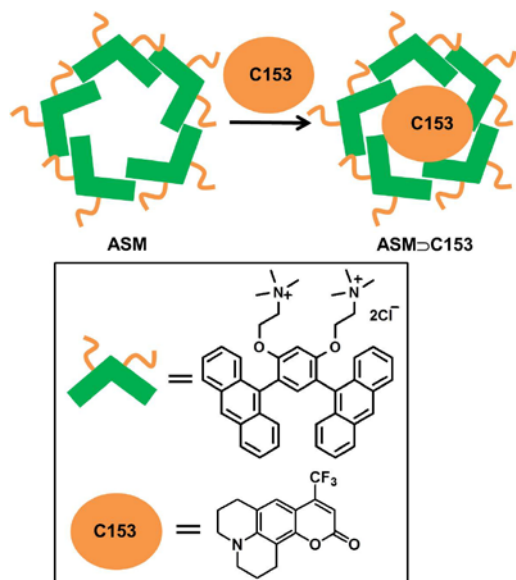


Fig. 1. Encapsulation of Coumarin 153 (C153) in ASM aggregate to form the ASM⊃C153 complex.

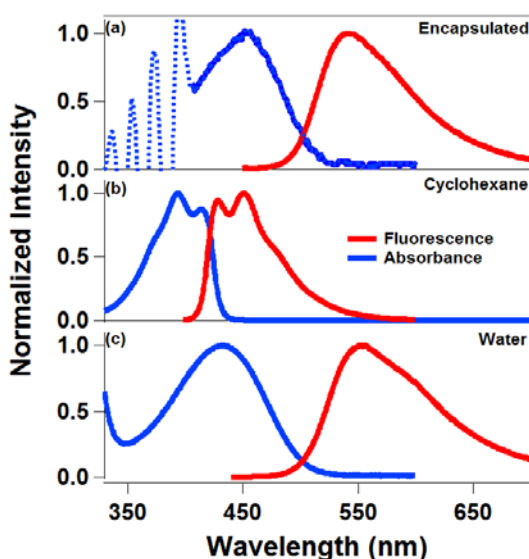


Fig. 2. Absorption and fluorescence spectra of C153 in various solvents and encapsulated in ASM. For the latter, the absorption spectrum of ASM was subtracted from that of ASM⊃C153. The region represented by the dotted line is considered unreliable.

We employed time-resolved spectroscopy to investigate the structure and properties of a novel anthracene-embedded amphiphile (AEA) that forms micelle-like aggregates in water. AEA consists of a nonpolar, anthracene moiety and a polar ammonium salt. When AEA is dissolved in water, the anthracene moieties minimize interaction with the solvent by aggregating into an anthracene-shelled micelle (ASM). ASM has a hydrophobic interior that allows it to encapsulate a hydrophobic chromophore, as depicted in Fig. 1.¹ This enables solubilization of the hydrophobic guest in water. In order to better understand the environment surrounding the encapsulated chromophore, we used the solvatochromic probe molecule, Coumarin 153 (C153), as a guest in the micelle. The absorption and fluorescence of C153 are highly sensitive to the local polarity, and can be used to characterize the surroundings.

The absorption and fluorescence spectra of C153 in various environments are presented in Fig. 2. The absorption and fluorescence maxima of C153 in cyclohexane and in water illustrate the red-shift of C153 in a highly polar (water) environment relative to a highly nonpolar (cyclohexane) one. The absorption maximum of encapsulated C153 ($\lambda_{\text{max}} = 457 \text{ nm}$) is red-shifted relative to that of C153 in water ($\lambda_{\text{max}} = 433 \text{ nm}$), suggesting that, despite being surrounded by nonpolar anthracene panels, the local polarity around C153 is greater than that of water. However, the fluorescence spectrum of encapsulated C153 ($\lambda_{\text{max}} = 541 \text{ nm}$) appears in a similar position to that of C153 in water ($\lambda_{\text{max}} = 553 \text{ nm}$). Thus, in contrast to C153 in water, C153 encapsulated in ASM shows very little shift between its absorption and fluorescence spectra, indicating

that little reorganization of the solvent and surroundings occurs following photoexcitation of encapsulated C153.

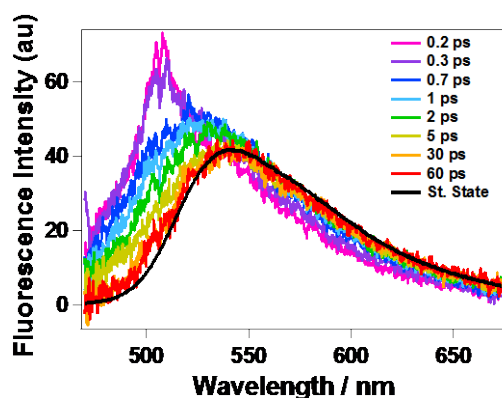


Fig. 3. Fluorescence upconversion showing very little dynamic Stokes shift for encapsulated C153.

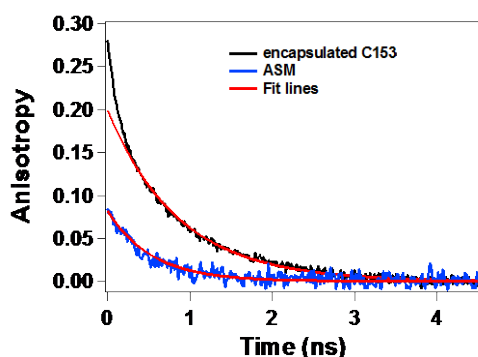


Fig. 4. Fluorescence anisotropy decays of the unoccupied ASM host, excited at 400 nm, and encapsulated C153, excited at 435 nm. The anisotropy was obtained using the fluorescence between 600 and 700 nm.

Since the position of the fluorescence spectrum is an indicator of the stabilization of the excited state dipole by the surroundings, the reorganization dynamics of the local environment was examined using the time-resolved fluorescence spectra of encapsulated C153 (Fig. 3). Consistent with the small difference between the excitation and fluorescence spectra, only a small dynamic Stokes shift was observed at the red edge of the spectrum, at early times. The larger shift and intensity loss at short wavelengths are attributed to encapsulation of multiple chromophores in some micelles. The multiple chromophores were found to show strong, short-lived emission at short wavelengths, consistent with emission from an H-dimer.

In addition to examining the solvation dynamics, we also examined the freedom of motion of the guest within the micelle, using the fluorescence anisotropy decay, as shown Fig. 4. Since both empty micelle and encapsulated guest are fluorescent, the fluorescence anisotropy of each was used to obtain their rotational time-constants. The encapsulated guest showed a time

constant of 860 ps, which is greater than the 510 ps time-constant obtained for the empty host. Since the guest cannot rotate more slowly than the host, the slower rotation of the encapsulated guest indicates that the guest and host rotate together as one unit. The rotational diffusion constant can be related to the size of the complex, using the Stokes-Einstein equation. Using this method, a diameter of 1.6 nm was obtained for the empty ASM micelle, and a diameter of 1.9 nm was obtained for the host-guest complex. Based on the ability of the micelle to adjust its size to accommodate one or more chromophores, we conclude that the aromatic micelle is a soft material with a range of possible conformations, rather than a simple, enclosed cavity.

¹ Kondo, K.; Suzuki, A.; Akita, M.; Yoshizawa, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 2308.

水溶液中におけるジシアノ金(I)錯体の励起 2 量体の超高速ダイナミクスと核波束運動

岩村宗高¹, 若林涼¹, 前馬純一¹, 野崎浩一¹, 竹内佐年², 田原太平²

富山大院・理工¹, 理研・田原分子分光²

凝縮相における分子間での化学結合の生成の瞬間におこる分子のダイナミクスを観測することは、化学反応の本質的理解のために必須である。しかしながら、フェムト秒分光でこのような過程を観測するためには、ある程度以上の量の分子集団に対して分子間の結合生成を光励起で同時に開始させなければならず、観測は通常容易ではない。

最も基本的な金(I)錯体である $[\text{Au}(\text{CN})_2^-]$ などの金(I)錯体が近接すると、金原子の間に金原子間相互作用と呼ばれるやや弱い引力が働く。この相互作用により溶液中で生成した金(I)錯体の会合体を光励起すると、電子遷移により金—金原子間の σ 結合性軌道が占有され、より強固な共有結合が生成する(図1)¹。従って、高濃度の

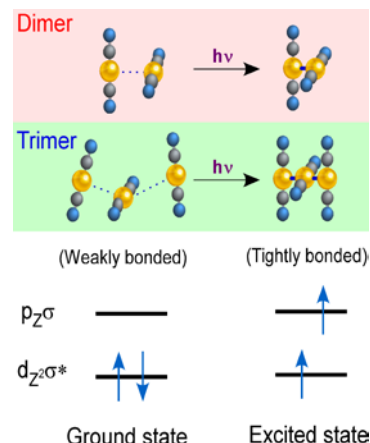


図1 ジシアノ金(I)会合体のフロンティア軌道と電子遷移

$[\text{Au}(\text{CN})_2^-]$ 水溶液に超短パルス光を照射し、この溶液の発光や光吸収スペクトルの時間変化を計測することにより、会合体中の金原子間に化学結合を生成させたときの会合体の構造変化の様子を観測することができる。

以前、我々は超高速時間分解分光法を用いて $[\text{Au}(\text{CN})_2^-]$ 水溶液中の 3 量体のダイナミクスに関する実験を行い、励起 3 量体中の金原子間の共有結合生成に伴う金—金間伸縮運動の振動をはじめて報告した²。また、結合生成に伴い、10 ps程度の時間をかけて 600 nm付近の過渡吸収帯の吸収強度が大きく増大していくことを見出した。量子化学計算の結果、会合体内における金原子の配列が折れ曲がった構造からまっすぐにならんだ構造への構造変形が、観測されたような光吸収強度の大きな増大を引き起こすことが示された。

最近、日本と韓国のグループによってX線自由電子レーザーを用いた高速時間分解X線分光の観測結果が報告された³。X線散乱の時間変化のデータ解析においても励起 3 量体の曲がった構造から直線構造への変形過程があることが示された。しかし我々の報告と異なり、この変形が 200 fs以内に完了すること、また 10 psまでの時間領域に現れる信号変化は金—金間の距離がさらに短くなる過程である、という主張がなされた。

この論争の解決のため、水溶液中に常に共存しているにも関わらず、これまで観測されてこなかったジシアノ金 2 量体のダイナミクスが注目される。2 量体は 3 量体のような会合体が曲がる自由度が存在しないので、励起 2 量体の過渡吸収信号の時間変化には励起 3 量体と大きな違いが生じるはずで

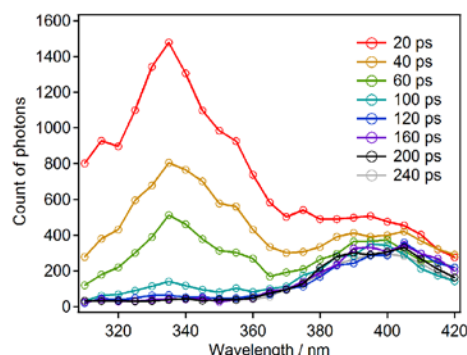


図2 ジシアノ金水溶液の時間分解発光スペクトル($\lambda_{\text{ex}} = 269 \text{ nm}$)

ある。また、溶液中におけるジシアノ金会合体のダイナミクスの理解のためには、最も基本的な 2 量体のダイナミクスの情報が必要不可欠である。そこで、我々は[Au(CN)₂]⁻水溶液中の 2 量体に対する超高速時間分解分光計測実験を行った⁴。

[Au(CN)₂]⁻の高濃度の水溶液は 260 nmより長波長側に濃度によって大きく変化する会合体由来の吸収帯を示す。[Au(CN)₂]⁻水溶液中では金原子間相互作用により 2 量体、3 量体といった複数の会合種の平衡が存在するので、時間分解分光においては、任意の会合種を選択的に励起することが重要である。各会合体の燐光に関しては、Pattersonらにより会合度に応じた詳細な帰属が行われている¹ので、励起直後に観測される発光から励起分子の帰属を行った。0.038 mol/dm³の水溶液に 270 nmの光を照射し、時間分解スペクトルを計測すると、励起直後は 2 量体の燐光に帰属される 330 nmの発光が観測され、25 psの時定数で減衰するのが観測された (図 2)。

濃度 0.038 mol/dm³、励起波長 270 nmの条件では、励起直後のスペクトルは 2 量体由来の発光が支配的であったので、この条件を用いて過渡吸収スペクトル測定を行った (図 3)。励起直後に 550 nm付近の吸収が 0.2 psの時定数で増大し、その後 26 psの時定数で減衰するのが観測された。続いて残った 560 nm付近の吸収が 1 ns程度の時定数で減衰するのが観測された。0.2 psの増大は 3 量体の項間交差過程との類似性から励起 2 量体の項間交差、26 ps、1 nsで減衰する吸収成分は、それぞれの燐光寿命と一致することから励起 2 量体、3 量体の減衰に対応すると考えられる。また、過渡吸収の時間変化に振動成分が存在するのが確認された。量子化学計算の結果、これらの振動数は、励起 2 量体の金-金原子間結合の伸縮振動による核波束運動に対応することわかった (図 4)。このことは、観測された過渡吸収帯が 2 量体由来であることをより確かにすると同時に、2 量体においても金原子間の結合生成が起こることを示す。

励起 2 量体においても、3 量体同様、金原子間の結合生成に伴うコヒーレントな振動が観測された。しかしながら、2 量体の吸収の時間変化では 10 ps までの時間領域で 3 量体で示されたような大きな吸収強度の増大は観測されなかった。これは、3 量体で観測された大きな吸収の増大が会合体における金原子が曲がった配置から直線型に変化する過程に対応することを強く示す。

【参考文献】

- (1)Rawashdeh-Omary, M. A.; Omary, M. A.; Patterson, H. H.; John P. Fackler, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11237.
- (2)Iwamura, M.; Nozaki, K.; Takeuchi, S.; Tahara, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 538.
- (3)Kim, K. H.; Kim, J. G.; Nozawa, S.; Sato, T.; Oang, K. Y.; Kim, T. W.; Ki, H.; Jo, J.; Park, S.; Song, C.; Sato, T.; Ogawa, K.; Togashi, T.; Tono, K.; Yabashi, M.; Ishikawa, T.; Kim, J.; Ryoo, R.; Kim, J.; Ihee, H.; Adachi, S.-i. *Nature* **2015**, 518, 385.
- (4)Iwamura, M.; Wakabayashi, R.; Maeba, J.; Nozaki, K.; Takeuchi, S.; Tahara, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**.

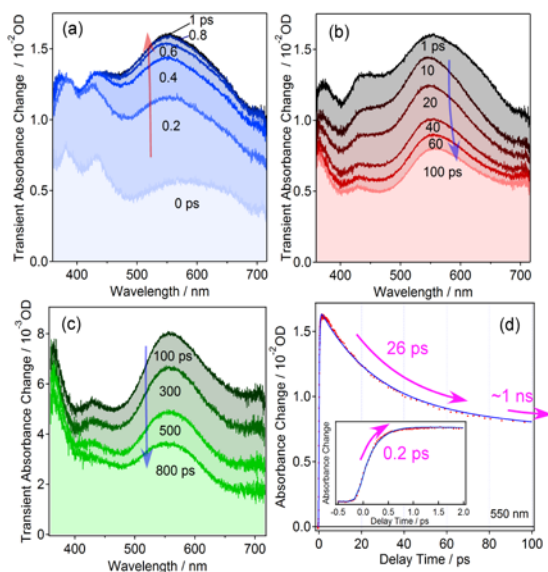


図 3 ジシアノ金水溶液の過渡吸収スペクトル (a~d)と時間変化(d)($\lambda_{\text{ex}} = 269 \text{ nm}$)

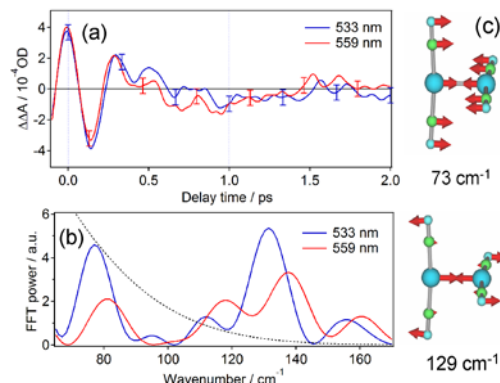


図 4 過渡吸収にて観測されたジシアノ金 2 量体における核波束運動に伴う振動成分(a)と振動スペクトル(b)および低波数領域における励起 2 量体の全対称振動モード(c)

蛍光タンパク質eGFP発色団モデル化合物の 二光子吸収スペクトルの溶媒依存性

細井晴子¹, 田山亮¹, 竹内佐年², 田原太平²

東邦大・理¹, 理研・田原分子分光²

蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP) を用いたイメージングは生命科学分野における最先端技術の一つであり、近年では特に、二光子励起による生細胞の三次元イメージングが広く利用されている。イメージング技術が確立している一方、その基礎となる二光子励起された GFP の発光メカニズムは、適切な観測手段が限られているため不明のままであった。

そこでわれわれは以前、新規に開発されたマルチプレックス二光子吸収分光法を用いて、最もイメージングに利用されるGFP変異体enhanced GFP (eGFP、図 1a) の二光子吸収 (TPA) スペクトルを精度よく測定した。観測されたTPAスペクトルが一光子吸収 (OPA) スペクトルと一致せず高エネルギー側に現れた (図 1b) ことから、eGFPでは、一光子励起によって生成する S_1 電子励起状態の近傍に”隠れた”電子励起状態 (S_2) が存在する (図 2b) と報告した[1]。しかしその後、蛍光励起スペクトル測定に基づき、eGFPの二光子励起過程に関与するのは S_2 励起状態ではなく、 S_1 の高い振動励起状態 ($S_1(v>0)$) (図 2a) であるという、われわれとは異なる帰属が報告された[2]。また計算化学によっても研究され広く議論になっている。そこで本研究ではeGFPの二光子励起過程への S_2 励起状態の関与を明確に証明することを目的として、eGFP発色団モデル化合物 4'-hydroxybenzylidene-2,3-dimethylimidazolinone (HBDI) の二光子吸収スペクトルの溶媒依存性を研究した[3]。HBDIは、eGFP発色団 (図 1c) の主鎖につながる部分をそれぞれメチル基に置換した有機化合物 (図 1d) である。

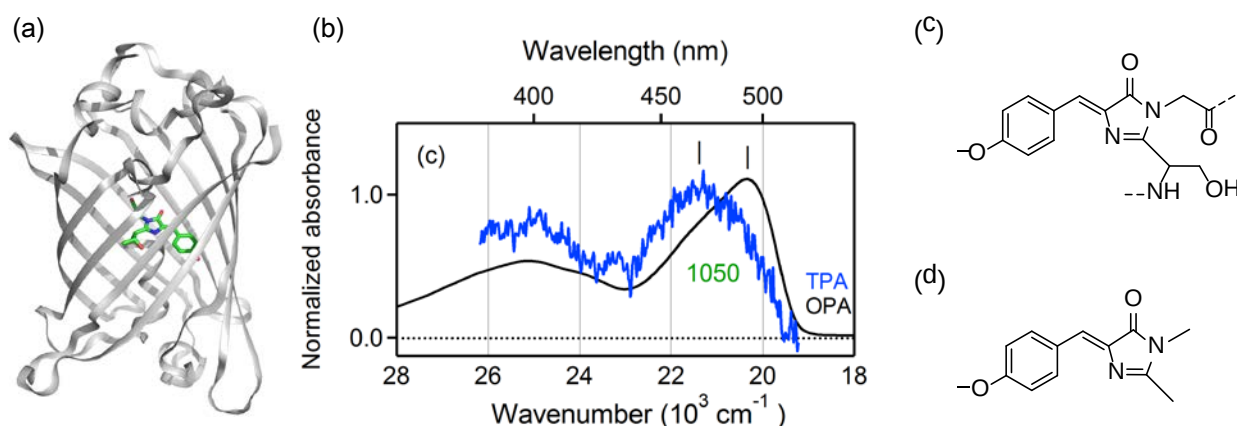


図 1. (a) eGFP の立体構造。(b) eGFP の一光子吸収 (OPA、黒)、および二光子吸収 (TPA、青) スペクトル。OPA と TPA ピークのエネルギー差を緑で示す (波数単位)。OPA と TPA スペクトルは一致せず、TPA ピークが OPA ピークと比較して 1050 cm^{-1} 高波数シフトする。(c) eGFP 発色団と(d) eGFP 発色団モデル化合物 HBDI の構造。

5種類の溶媒（メタノール、酢酸エチル、アセトニトリル、*N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO））中のHBDIのOPAおよびTPAスペクトルを図3に示す。eGFPと同様に、全ての溶媒中でHBDIのTPAスペクトルはOPAスペクトルと一致せず、高エネルギー側に現れた。またOPAとTPAピークのエネルギー差は $670\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ と溶媒によって大きく変化した。この結果は $S_1(v>0) \leftarrow S_0$ 遷移への帰属（図2a）と矛盾する。なぜならば、 $S_1(v>0) \leftarrow S_0$ 遷移と考える場合、OPAとTPAピークのエネルギー差は関与する振動モードのエネルギーに相当するが、その溶媒依存性は一般に非常に小さい（数 cm^{-1} 程度）からである。よって、HBDIの二光子励起過程に関与するのは $S_1(v>0)$ ではなく S_2 励起状態（図2b）であると結論した。

HBDIで得られた結論を適用してeGFPの二光子励起蛍光過程を理解することができる。二光子励起されたeGFPはまず S_2 状態となるが速やかに S_1 状態へと緩和する。その S_1 状態の蛍光は、一光子励起によって観測される蛍光と全く同じとなる。本研究により、最も広く利用されるeGFPの二光子蛍光メカニズムを明らかにすることができた。

- [1] H. Hosoi, S. Yamaguchi, H. Mizuno, A. Miyawaki, and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2761-2763 (2008).
- [2] M. Drobizhev, S. Tillo, N. S. Makarov, T. E. Hughes, A. Rebane, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 855-859 (2009).
- [3] H. Hosoi, R. Tayama, S. Takeuchi, and T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.*, **630**, 32-36 (2015).

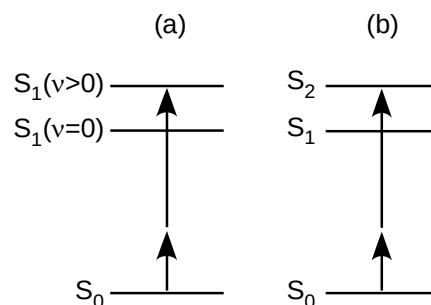


図2. eGFPとHBDIの二光子スペクトルの高波数シフトの起源として考えられる二つのメカニズム。(a) S_1 の振動励起状態への遷移。(b)異なる電子励起状態への遷移。

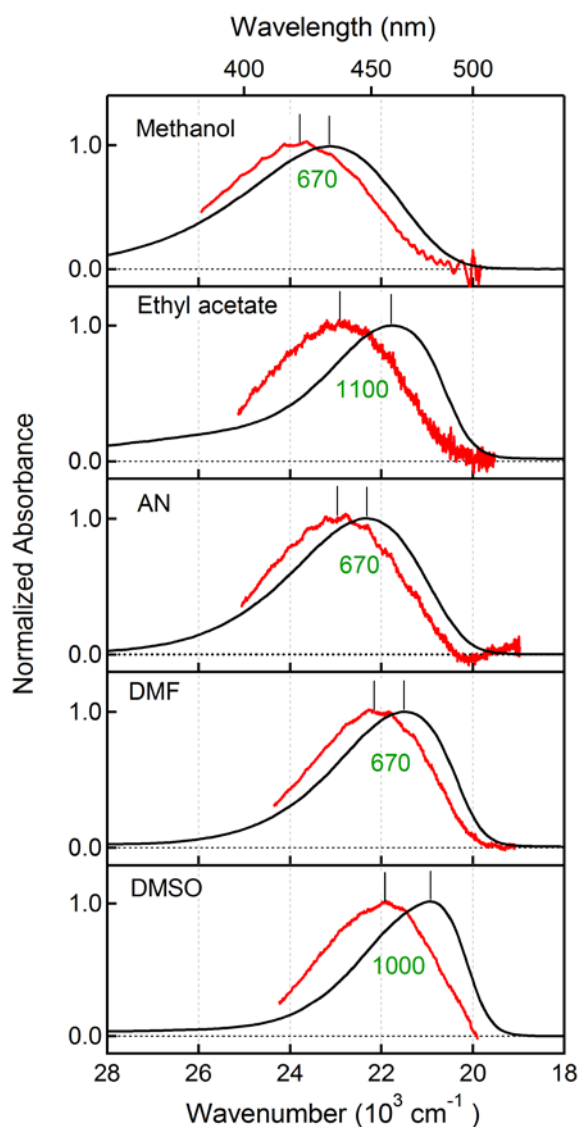


図3. HBDIの一光子吸収(OPA、黒)、および二光子吸収(TPA、赤)スペクトル。OPAとTPAスペクトルが一致しない。また溶媒によってエネルギー差が大きく異なる。

糖鎖イオン移動度質量スペクトルの理論予測に向けて

李秀榮¹, 渡部茂久^{1,2}, 二島渉¹, 杉田有治¹

理研・杉田理論分子科学研究室¹, 中央大学・理工²

細胞の表面や内部には、種類や長さ、分岐構造の異なる糖鎖が多く存在する。糖鎖はタンパク質や脂質に結合し、分子認識を通じて細胞の分化や免疫など基本的な生命現象と関係している。糖鎖構造の少しの違いにより糖鎖が結合した分子の生理活性が大きく変わることも珍しくなく、関連糖鎖を精密に特定し立体構造を決定することは、生命現象の理解と診断・創薬応用で重要な課題である。しかし、糖鎖構造の複雑さや柔軟性が原因で、現在でも糖鎖構造解析は困難を極めている。イオン移動度質量スペクトル (IM-MS) は、気相中の標的イオンを質量だけでなく大きさや形 (衝突断面積、CCS) で分離することが出来るため、複雑な生体分子の構造解析に有用とされる。IM-MSを用いれば、通常の質量分析では区別することの出来ない糖鎖の構造異性体を分離することが出来き、糖鎖構造を精密に特定する有力な手段として期待されている。しかし、1) CCSが単一コンフォマーに由来するのか、それとも複数コンフォマーの情報を含んでいるのか、2) イオン化がCCS (コンフォメーション) にどう影響するのかなど、CCSの物理化学的な起源は良くわかっていない。本研究では、これらの問いに答えるために、10種類のイオン化N型糖鎖の分子動力学 (MD) 計算を行い、理論的に求めた CCS と実験結果[1]を比較した (図1)。上記の問いに正しく答えるためには、正確なモデルと十分な構造探索が必要不可欠である。そこで私たちは構造探索の効率を上げるためにレプリカ交換分子動力学法 (REMD法) [2]を用いた。REMD法は、通常のMD計算では起こりづらいコンフォマー間の遷移を加速し広い構造空間の探索を可能にする。従来のMD計算が幾つかの低エネルギー構造に対してCCS評価を行うのに対して、構造アンサンブルに基づいたCCS計算を行った。さらに、実験で扱われているイオン化糖鎖 (プロトン化ピリジルアミノ糖鎖 (PA-glycan + 2H⁺)) を厳密に再現したモデルを用いて、実験との直接的な比較を行った。計算に必要な力場パラメータは既存の力場をもとに新たに作成した。プロトン化の位置は実験的に知られておらず、量子化学計算を行い、ピリジルアミノ基と α 1-3鎖または α 1-6鎖にプロトンが付加した二つのモデルを構築した。REMD計算には16レプリカを用いた (温度範囲は300K~1058K)。各糖鎖に対して全0.8 μ s

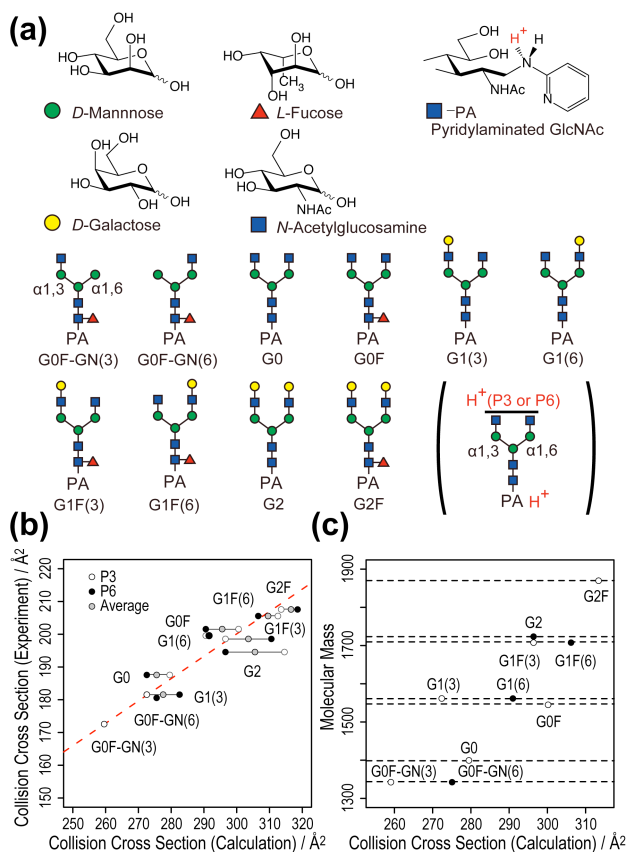


図1. 10種類のイオン化糖鎖モデル (a) と計算から求めた衝突断面積 (b, c)。(白: α 1-3 鎖がプロトン化、黒: α 1-6 鎖がプロトン化、グレー: 平均値)

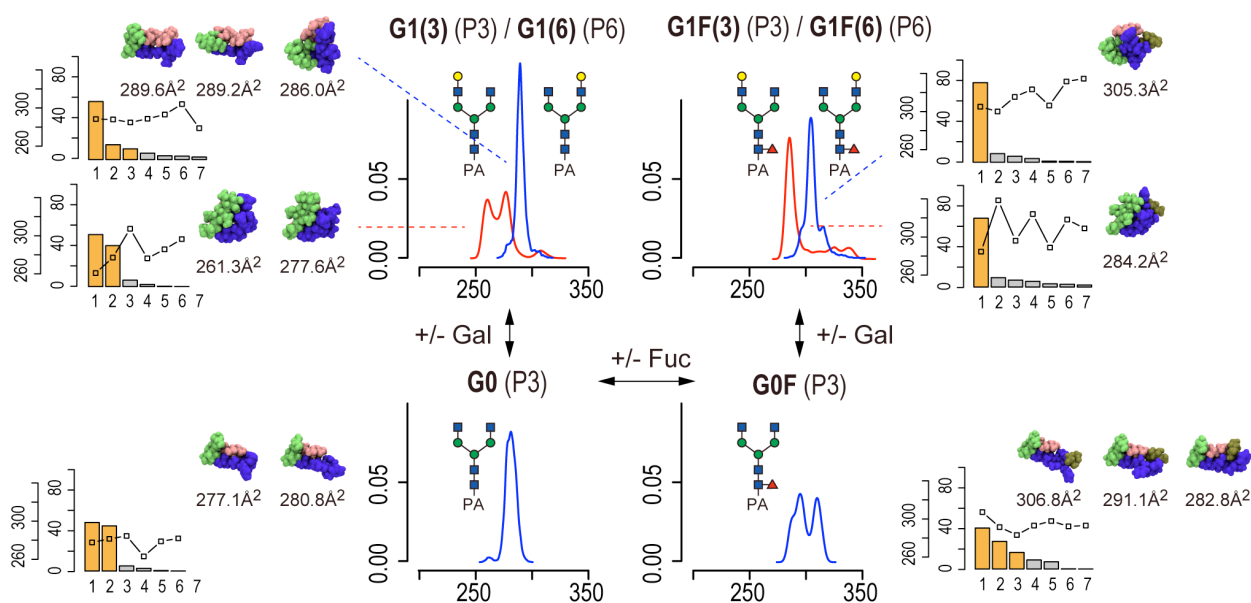


図2. REMD 計算から求めた G0、G0F、G1、G1F の衝突断面積分布とクラスター解析から求めた主コンフォマー。

の計算を行った。REMD計算にはREIN[3]を、衝突断面積の計算にはMOBCAL[4]を用いた。

最初に、イオン化がCCSに与える影響を検討した(図2)。その結果、プロトン化状態(α 1-3鎖がプロトン化するか α 1-6鎖がプロトン化するか)によってCCSの値が大きく異なることがわかった(平均して $8.9 \text{ \AA}^2$)。また、実験値との比較からプロトン化状態を理論的に推定した結果、多くの場合で α 1-3鎖がプロトン化していることも示唆された。プロトン化状態を仮定すると、計算結果は実験データと良い対応を示す。実験データに見られる異性体間のCCS分離も良く再現されている(実験値: $7 \text{ \AA}^2 - 18 \text{ \AA}^2$ に対して計算値: $10 \text{ \AA}^2 - 19 \text{ \AA}^2$)。そこで次に、CCSの分布から構造アンサンブルを検定した。CCS分布は比較的シャープであり、特定のコンフォマーからの寄与が支配的であると考えられる。クラスター解析の結果もこのことを支持する。構造的には、コンパクトな球状のものと棒状のものに分類することが出来る。CCSの値は常に後者で前者よりも大きくなっている。異性体ペアに着目すると、 α 1-3鎖が α 1-6鎖より長いものが球状、逆のものは棒状の構造をとっている。G0にGal残基が付加したG1(3)とG1(6)の水素結合解析を行った結果、棒状の構造では α 1-6鎖とキトビオース間に高頻度で水素結合が形成されていることがわかった。 α 1、6結合は、柔軟性が高く折れ畳み易くなっていると考えられる。これらの結果は、分岐鎖を繋ぐ結合の柔軟性と分子内水素結合がCCS(コンフォメーション)を決める主要な因子であることを示す。

本研究では、10種類のイオン化N型糖鎖のREMD計算を行い、IM-MSスペクトルによる構造異性体分離の物理化学的な基盤を明らかにした。今後は新規糖鎖のスペクトルも理論的に予測することが出来ると期待しており、精密な構造情報に基づいた新たな糖鎖機能解析につなげたい。

【参考文献】

[1] Yamaguchi, Y. et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2012**, 26, 2877. [2] Sugita, Y and Okamoto, Y. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 314, 141. [3] Miyashita, N. et al. *Int. J. Quantum. Chem.* **2015**, 115, 325. [4] Mesleh, M. et al. *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 968.

レプリカ交換分子動力学法と非調和振動状態計算による

ポリペプチドの振動状態解析

大滝大樹¹, 八木清¹, 石内俊一², 藤井正明², 杉田有治¹

理研・杉田理論分子科学研究室¹, 東工大資源研²

[序] 近年、実験技術の進歩により、蛋白質の一部を切り取ったポリペプチドを非破壊的に気化し、高分解能の振動スペクトルを取得することが可能になった。しかし、系の巨大化に伴いスペクトルは複雑化するため、100原子に及ぶポリペプチドの振動スペクトルを帰属するには理論計算が必要不可欠である。従来、振動スペクトルの解釈は、量子化学計算により最安定構造の探索と調和近似に基づくスペクトル計算を行い、実験により得られたスペクトルと比較することで行われてきた。しかし、ポリペプチドは非常に柔軟な構造を持ち、膨大な数の準安定状態が存在するため、最安定構造の探索は容易ではない。さらに、非調和性の強い水素結合が分子内に多数存在し、調和近似に基づく振動スペクトルは信頼性が低い。

本研究では、広い構造空間を効率良く探索できるレプリカ交換分子動力学法 (REMD) と非調和性を考慮した振動状態計算を組み合わせる

ことで、上記の問題を克服する。アドレナリン受容体のレセプター部に相当する5残基ペプチド Ser-Ile-Val-Ser-Phe-NH₂ (SIVSF: 図1)

のNH/OH伸縮領域の振動スペクトルを計算し、実験で得られたスペクトルと比較することで、振動バンドの帰属を決定した。

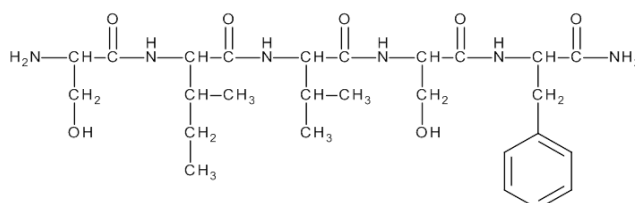


図 1: Ser-Ile-Val-Ser-Phe-NH₂ の化学式。

[方法] まず、REMDを用いて構造探索を行った。この方法は、温度の異なる複数の系のコピー (レプリカ) の分子動力学計算を独立・並行的に実行し、適当な頻度で隣り合うレプリカ間の温度を交換することで、幅広い構造空間のサンプリングを可能とする。本研究では実験条件に合わせて真空中で計算を行った。ペプチドの力場はCHARMM36を使用し、シミュレーションの温度領域は300K-1300Kとして12個のレプリカを用意し、30,000点のスナップショットを取得した。次に、得られたスナップショットに対してクラスタ解析を行い、150個の候補構造を抽出した。得られた候補構造に対して量子化学計算による構造最適化を行い、その結果からエネルギーが低い構造を選びスペクトル計算を行った。

スペクトル計算は、近年、著者らにより提案された最適化座標に基づく振動擬縮退摂動法[1]を用いた。スペクトル計算の具体的な手順は以下の通りである。1) 量子化学計算により基準振動座標を計算、2) 基準振動座標に基づき4次のテイラー展開ポテンシャル(Quartic Force Field: QFF)を構築、3) NH/OH伸縮およびそれらと結合の強い振動モードを計80個選び出す、4) 抽出した振動モードに対して最適化座標を得る、5) 非調和性が特に強い振動モードを判別し、その領域に対しグリッドポテンシャル[2]を構築、6) 2次の振動擬縮退摂動 (VQDPT2) 法[1,3]を用いて、得られた非調和ポテンシャルに基づく振動状態計算を実行する。構造最適化、ポテンシャル生成のための量子化学計算には全てDFTのB3LYP汎関数を用い、基底関数はNHとOHに対して6-31++G(d,p)、他は6-31G(d,p)とした。

[結果] REMD計算により得られたトラジェクトリーを解析し、ラマチャンドラプロットを求めた。高温 (1300 K) では、いずれの残基も広い構造空間をサンプルし、エネルギー地形が似た形になることを確認した。300 Kの結果を図2に示す。図2から、SIVSF

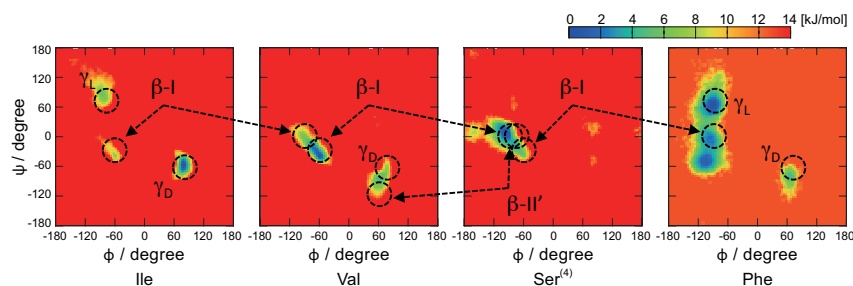


図 2: REMD 計算 (300K) により得られた SIVSF のラマチャンドラプロット。点線で囲った部分は γ turn や β turn の位置を示す。

は、タンパク質において一般的な2次構造である α ヘリックスや β シートの領域は安定でなく、 γ ターン (γ_L と γ_D) や β ターン (type I, type II') などがエネルギー的に安定と分かった。

図2の安定点をカバーするようにスナップショット構造を取り出し、量子化学計算により最安定構造を求めた。得られた構造の水素結合パターンを図3に示す。図2から示唆されるように、最安定構造は主鎖のアミド基により γ ターンを2つ、 β ターンを1つ持つ。さらに、IleのNH基とPheのCO基を結ぶ逆向きの水素結合が生成している。

この構造に対しVQDPT2法により振動スペクトルを計算した。計算により得られたスペクトルと実験により得られたスペクトルとの比較を図4に示す。両者は良く一致しており、計算結果からスペクトルの帰属を決定できた。ポリペプチドのような柔らかく膨大な数の準安定構造を持つ系の構造予測に対して、レプリカ交換分子動力学法による効率的な配座サンプリングと最適化座標による非調和振動状態計算を組み合わせた本手法の有効性が示された。

【参考文献】

- [1] K. Yagi, M. Keçeli, and S. Hirata, J. Chem. Phys., **137**, 204118 (2012); K. Yagi, H. Otaki, J. Chem. Phys., **140**, 084113 (2014); 分子科学討論会 2013、講演番号 3P114.
- [2] K. Yagi, S. Hirata, and K. Hirao, Theor. Chem. Acc., **118**, 681 (2007)
- [3] K. Yagi, S. Hirata, and K. Hirao, Phys. Chem. Chem. Phys., **10**, 1781 (2008)

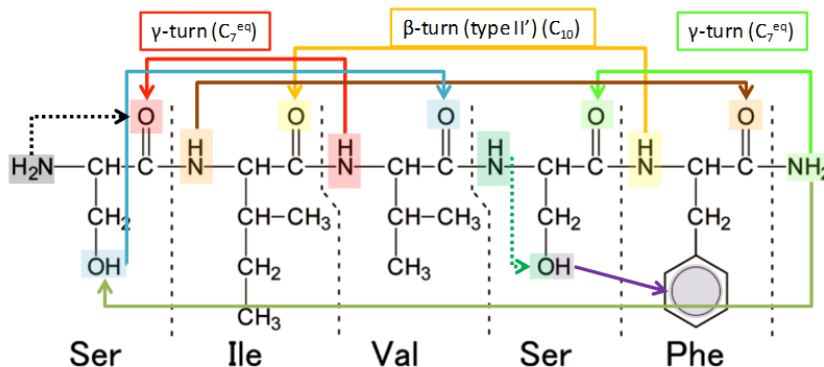


図 3: 最安定構造における水素結合。実線は比較強い水素結合、点線は弱い水素結合を表す。

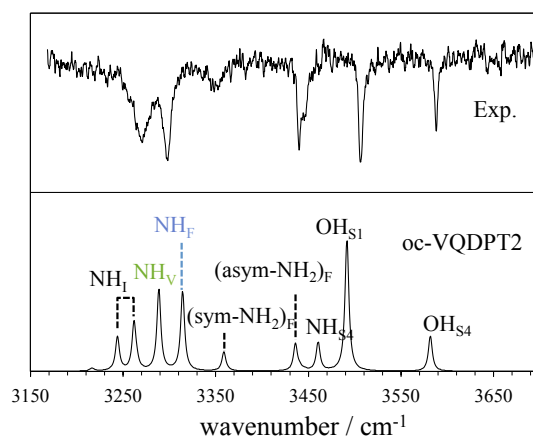


図 4: 実験スペクトル (上) と本研究により得られた計算スペクトル (下)。

分子動力学プログラムGENESISへのQM/MM法の実装

八木清, 杉田有治

理研・杉田理論分子科学研究室

[序] 近年、我々のグループでは分子動力学 (MD) 計算プログラムGENESISをスクラッチから開発してきた[1]。GENESISは、MD計算において標準的な手法を実装するだけでなく、極めて並列効率の高い独自のアルゴリズムを開発することで、京コンピュータのような超並列計算機の性能を十分に引き出し、大規模な系や長時間のシミュレーションを実現した。GENESISを用いることで、生体分子の構造ゆらぎを十分に考慮した信頼性の高い計算が可能になりつつある。

一方、既存の方法は、原子間に働く力を経験的な力場関数で近似していることに伴う様々な限界がある。特に、分光学的観測量 (振動・電子スペクトルなど) や反応機構 (経路とエネルギー障壁など) を十分な精度で計算できないため、実験的計測との接点を作れないことが問題である。このような力場関数の欠点を補うため、QM/MM法が提案されている[2]。QM/MM法は、化学的に重要な領域は高精度な量子化学 (QM) 計算で扱い、それ以外の生体環境を力場関数 (MM) により扱うマルチスケールモデルである。この方法により、特に酵素反応の反応機構を原子・分子レベルで理解することが可能になった。QM/MM法の最初の提案者である Warshel, Karplus, Levittの3氏には2013年にノーベル化学賞が贈られている。

本研究ではQM/MM法をGENESISの新しい機能として実装した。さらに、効率のよい構造最適化アルゴリズムと調和振動解析のプログラムを実装した。

[QM/MM法] QM/MM法では、QM領域の電子と原子核、MM領域のMM原子を構成粒子とし、分子系を記述する。原子核とMM原子の座標を $\mathbf{R}_N$, $\mathbf{R}_A$ とすると、系のハミルトニアンは以下のようになる、

$$H = T_A + T_N + V_{QM/MM}(\mathbf{R}_N, \mathbf{R}_A), \quad (1)$$

ただし、 T_A と T_N は原子核とMM原子の運動エネルギーである。ポテンシャルエネルギーは、

$$V_{QM/MM}(\mathbf{R}_N, \mathbf{R}_A) = V_e(\mathbf{R}_N, \mathbf{R}_A) + \sum_{N,A} V^{\text{vdW}}(R_{NA}) + V^{FF}(\mathbf{R}_A), \quad (2)$$

となる。右辺第2項と第3項は原子核-MM原子間のvan der Waals相互作用とMM原子による力場関数である。右辺第1項はQM領域の静電エネルギー、

$$V_e = \langle \Psi_e | \hat{T}_e + \sum_{i>j} \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{i,N} \frac{Z_N}{r_{iN}} - \sum_{i,A} \frac{Q_A}{r_{iA}} | \Psi_e \rangle + \sum_{N>N'} \frac{Z_N Z_{N'}}{R_{NN'}} + \sum_{N,A} \frac{Z_N Q_A}{R_{NA}}, \quad (3)$$

ただし、 r_{ij} , r_{iN} , r_{iA} はそれぞれ電子-電子間距離、電子-核間距離、電子-MM原子間距離、 Z_N , Q_A は核電荷とMM原子電荷、 Ψ_e は電子波動関数である。

V_e とその核座標やMM原子座標による微分は多くの量子化学計算パッケージで計算できる。GENESISから、QM計算のインプットファイルを生成し、QMプログラムをシステムコールし、アウトプットファイルから必要な情報を取り出すインターフェースプログラムを作成した。現状

ではQ-ChemとGaussian09に対応している。式(2)の右辺第2項と第3項は通常の力場関数であり、GENESISに既に実装されているルーチンを用いて計算する。

[調和振動解析] 調和振動解析には、まずエネルギー微分が十分小さくなるまで構造を最適化する必要がある。GENESISには、エネルギー勾配の接線方向へたどるsteepest descent (SD) 法が実装されているが、この方法は収束が悪いため、厳しく最適化するのには向かない。そこで、擬似的なNewton-Raphson法の1つであるL-BFGS-Bアルゴリズム[3]を実装した。

最安定構造が求まった後、その周りでの2次微分行列 (Hessian) を求めれば、それを対角化することで調和振動数と基準振動ベクトルが求まる。Hessianは1次微分の数値微分で求める、

$$h_{NN'} = \frac{\partial^2 V}{\partial R_N \partial R_{N'}} = \frac{\partial g_N}{\partial R_{N'}} \cong \frac{g_N(+\delta R_{N'}) - g_N(-\delta R_{N'})}{2\delta R_{N'}}. \quad (4)$$

数値微分には多くの点で1次微分を求める必要があるが、これらの計算は並列実行できるため、並列計算機を用いればよい。この場合、点の数は系のサイズに対して線形にしか増えないので、大きな問題にならない。

[テスト計算] 光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (bR) に対する応用計算を行った。図1aのように、光受容体であるレチナールと、その周辺にある水分子とアスパラギン酸、アルギニンが構成する水素結合ネットワークをQM領域とし、それ以外をMM領域とした。

図1bに構造最適化のステップに対するエネルギー変化を示す。従来のSD法では20ステップあたりからエネルギーが下がらなくなるのに対し、L-BFGS-B法では十分にエネルギーが下がっており、CHARMMと遜色ないパフォーマンスを示している。図1cに調和振動スペクトルを示す。高波数側には水素結合に参与しているプロトン化シッフ塩のND伸縮バンドや水分子のOD伸縮バンドが強く出ており、また低波数側にはレチナール由来のバンドが計算されている。実験との比較など、詳細な解析は今後行う。

【参考文献】

[1] J. Jung, T. Mori, C. Kobayashi, Y. Matsunaga, T. Yoda, M. Feig, and Y. Sugita, WIREs Comput. Mol. Sci. **5**, 310 (2015). [2] A. Warshel and M. Karplus, J. Am. Chem. Soc. **94**, 5612 (1972); A. Warshel and M. Levitt, J. Mol. Biol. **103**, 227 (1976). [3] <http://users.iems.northwestern.edu/~nocedal/lbfgsb.html> より Fortran ソースコードが無料配布されている。

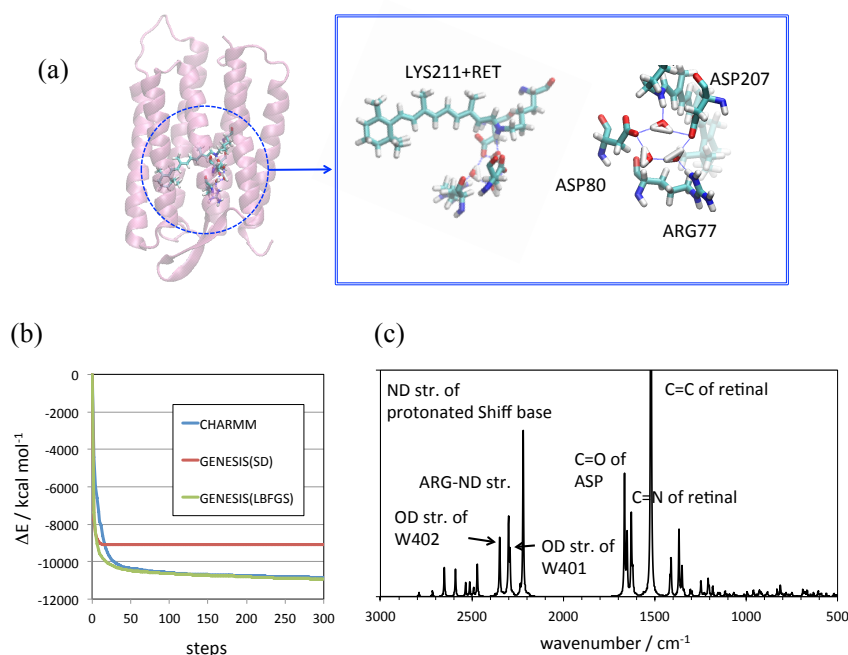


図 1a. bR の全体構造 (左) と QM 領域の拡大図 (右). 1b. 構造最適化のステップに対するエネルギー変化. 1c. QM 領域に対する調和振動スペクトル.

Single molecule absorption spectroscopy using a scanning tunneling microscope

Hiroshi Imada¹, Kuniyuki Miwa¹, Miyabi Imai-Imada², Shota Kawahara², Kensuke Kimura², and Yousoo Kim¹

¹Surface and Interface Science Laboratory, RIKEN

²Department of Advanced Materials Science, Graduate School of Frontier Science, The University of Tokyo

The electronic excitation of molecules triggers diverse phenomena, such as luminescence, photovoltaic effects, and various chemical dynamics. Absorption spectroscopy is the primary technique to directly investigate the excitation process, and researchers have been pursuing higher spatial resolution and sensitivity to promote understanding and control of the molecular excited states, envisaging creation of novel functionalities with organic materials. To date, several kinds of principles for realizing single-molecule absorption spectroscopy have been proposed based on either far-field¹ or near-field² optics. However, detailed characterization of the electronic excitation of a single molecule remains infeasible because of the limited spatial resolution of the optical methods.

Here we demonstrate the measurement of the absorption spectra of a single isolated free-base phthalocyanine (H₂Pc) molecule using the localized plasmon as a spatially controllable point excitation source driven by the tunneling current of a scanning tunneling microscope (STM). Figure 1(a) illustrates the design of the experiment. The tunneling current excites the localized plasmon which then interacts with the molecule through the plasmon-exciton coupling, and the emitted photons are detected.

A series of luminescence spectra induced by the tunneling current were obtained near an H₂Pc/NaCl as a function of the lateral distance of the STM tip from the molecular center (Fig. 1(d)). When the tip is placed far from the molecule ($r \geq 4$ nm), the luminescence spectrum is dominated by a broadband emission, which is attributed to

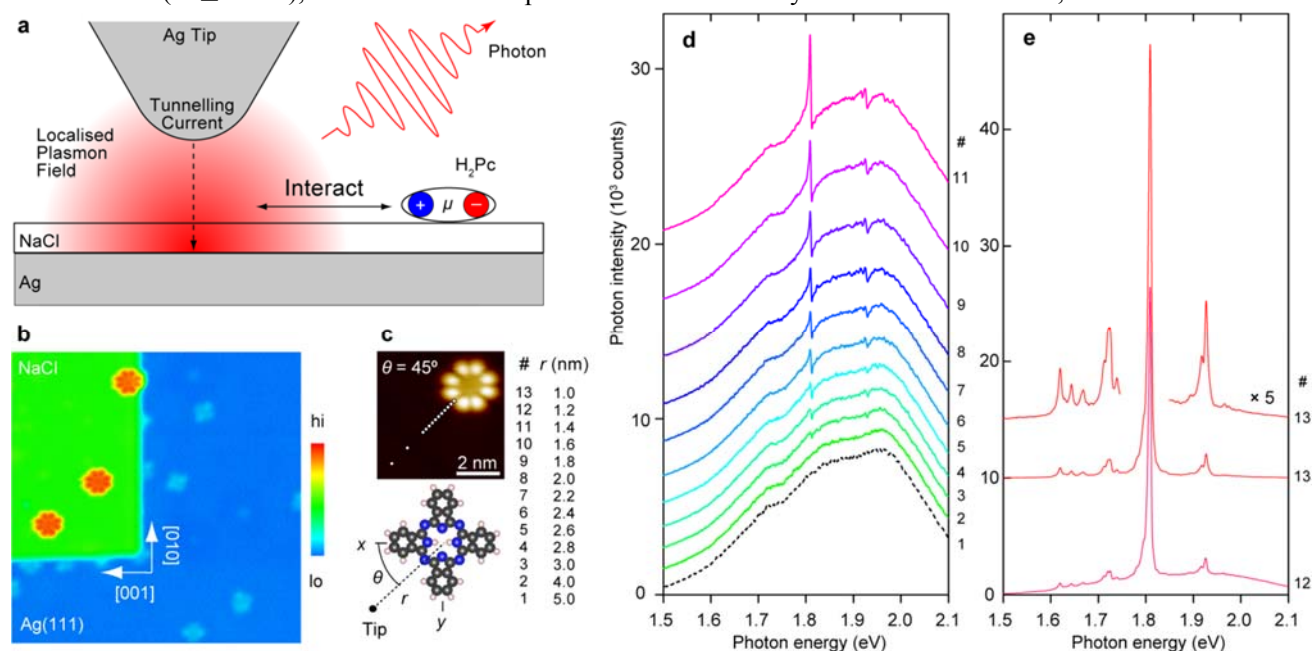


Figure 1 (a) A schematic illustration of the design of the experiment. The localized plasmon in the STM junction excited by the tunneling current interacts with an isolated single molecule located close to the tip apex. μ represents the transition dipole moment of H₂Pc, which is oriented in the molecular plane. (b) An STM topographic image of H₂Pcs adsorbed on a 3 monolayer (ML)-thick NaCl(100) island grown on Ag(111) (sample bias voltage $V = -2.5$ V, tunneling current $I = 2$ pA, 25×25 nm²). (c) the measurement tip positions for the spectra shown in d and the definition of the coordinates around the molecule. An H₂Pc has two hydrogen atoms with a *trans* configuration at the molecular center. The column on the right is the list of the distances (r) measured from the molecular center. (d, e) A series of STS spectra measured on and near an H₂Pc/3ML-NaCl with different tip positions ($V = -2.3$ V, $I = 50$ pA, exposure time $t = 3$ min). The spectra are offset for clarity.

the radiative decay of the localized plasmon. Remarkably, dip structures emerge at 1.81 and 1.92 eV in the broad spectrum when the tip is positioned close to the molecule ($r = 1.4\text{--}3$ nm), and the spectral features becomes prominent as the tip is closer to the molecule. When the STM tip reaches at the edge of the molecule where direct excitation of the molecule by carrier injection turns into possible, intensive molecular luminescence is observed (Fig. 1(e)). The luminescence peaks at 1.81 and 1.92 eV are attributed to transitions from the first and second singlet excited states of H₂Pc, so-called the Q_x and the Q_y states, respectively³.

Figure 2(a) shows two representative STL spectra measured with tip positions far from and close to the molecule. We define the STL spectrum measured with the tip located far from the molecule as the excitation source spectrum I_0 , and that measured close to the molecule as $I(r, \theta)$. As shown in Fig. 2(b), the ratio spectrum I/I_0 clearly reveals the change in the spectral shape resulting from the plasmon-exciton coupling.

The origin of the dip structures is investigated based on the theory of STL using the nonequilibrium Green's function method⁴. Figure 2(c) shows calculated STL spectra with the plasmon-exciton coupling $\hbar g$ of 0 and 10 meV, and Fig. 2(d) displays the I/I_0 spectrum. When $\hbar g = 10$ meV, the energy of localised plasmons is absorbed by the electronic transitions of the molecule through the plasmon-exciton coupling, which leads to the dip structures at 1.81 and 1.92 eV. The asymmetric spectral profile is explained by a quantum mechanical interference effect. The energy of localised plasmons is absorbed by the molecule, and then the energy of the excited molecule is re-emitted into localised plasmons (Fig. 2(e)). The I/I_0 spectrum reproduces the features seen in the typical absorption spectrum of H₂Pc³, which essentially represents the single-molecule absorption spectrum of H₂Pc.

In conclusion, we have developed a novel single molecule absorption spectroscopy by using a localized plasmon at the tip of an STM to overcome the diffraction limit of light. Based on the versatility of STM, the novel absorption spectroscopy in combination with STL establishes an absorption/emission spectroscopy, providing an integrated platform for real-space investigation of localised excited states.

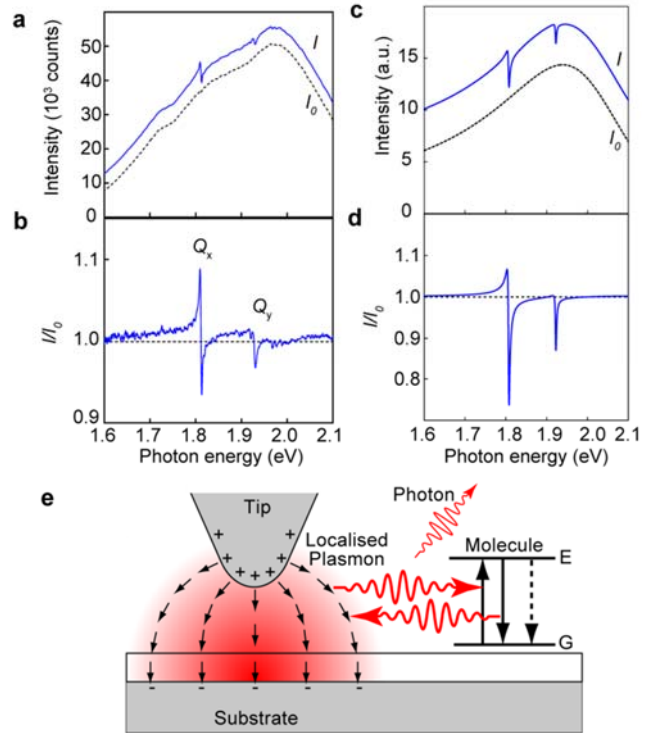


Figure 2 (a) STL spectra measured with $r = 2.2$ nm (upper) and 4 nm (lower) ($\theta = 45^\circ$, $V = -2.5$ V, $I = 250$ pA, $t = 5$ min). (b) An $I(r, \theta)/I_0$ spectrum ($r = 2.2$ nm, $\theta = 45^\circ$), generated by dividing the upper curve (I) with the lower curve (I_0) in a. (c) Calculated luminescence spectra using the theory of STL with plasmon-exciton coupling $\hbar g$ of 0 (lower) and 10 meV (upper). (d) An I/I_0 spectrum using the two simulated spectra in c. (e) A schematic diagram illustrating the dynamic processes arising from the plasmon-exciton coupling. G and E stand for the ground and excited states of the molecule, respectively. The energy of the localised plasmon is absorbed by the molecule (upward arrow) through the electromagnetic interaction between the plasmon and the molecule, and then the energy is re-emitted into plasmons (downward solid arrow) or the energy is non-radiatively dissipated (downward dashed arrow).

- [References]** 1) M. Celebrano, P. Kukura, A. Renn, and V. Sandoghdar, Nat. Photonics 5, 95 (2011).
 2) I. Gerhardt, *et al.*, Phys. Rev. Lett. 98, 033601 (2007).
 3) C. Murray, *et al.* Phys. Chem. Chem. Phys. 13, 17543 (2011).
 4) K. Miwa, M. Sakaue, and H. Kasai, J. Phys. Soc. Jpn. 82, 124707 (2013).

Seamless growth of a supramolecular carpet

Ju-Hyung Kim^{1,2,3,4}, Jean-Charles Ribierre³, Yu Seok Yang³, Chihaya Adachi³, Maki Kawai⁴,
Jaehoon Jung^{1,5}, Takanori Fukushima⁶ & Yousoo Kim¹

¹Surface and Interface Science Laboratory, RIKEN, Japan

²Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, Republic of Korea

³Center for Organic Photonics and Electronics Research (OPERA), Kyushu University, Japan

⁴Department of Advanced Materials Science, The University of Tokyo, Japan

⁵Department of Chemistry, University of Ulsan, Republic of Korea

⁶Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology, Japan

Organic thin films have received much attention for their potential in various electronic and optoelectronic device applications, since they have outstanding advantages (i.e., low cost, low weight and mechanical flexibility) in comparison to standard inorganic technologies [1]. In particular, it has been recognized in recent years that organic/metal interfaces at which charge carriers are injected into organic thin films play a crucial role in the operation and performance of organic devices [2]. Various interactions at the organic/metal interface, such as surface-molecule and intermolecular interactions, are of great importance in the formation of intermolecular networks and organic epitaxy, and have a strong correlation with their electronic structures [2,3]. Although the purity and uniformity of organic thin films at the organic/metal interfaces have profound effects on the operating characteristics of organic devices [2], the formation of organic thin films with high interfacial uniformity on metal surfaces has suffered from the intrinsic limitation of molecular ordering imposed by surface step edges, due to the relatively weak intermolecular interactions between organic molecules. Thus, the creation of widely uniform organic thin films on metal surfaces that maintain structural integrity based on non-bonding intermolecular interactions remains a challenge for further development and enhancement of organic devices fabricated by one-step deposition of organic molecules.

In this work, we successfully demonstrate the formation of a supramolecular carpet, with a widely uniform interfacial structure and high adaptability, on a metal surface, via a one-step deposition process. The geometric and electronic structures of the supramolecular carpet were investigated by means of scanning tunneling microscopy/spectroscopy and density functional theory calculations. For this work, bis[1,2,5]thiadiazolotetracyanoquinodimethane (BTDA-TCNQ) was used as the key building block with which to realize the supramolecular carpets [4], not only on a single crystal gold (Au) surface but also on a pre-annealed amorphous Au surface (see Fig. 1). Tetracyanoquinodimethane (TCNQ) is one of the strongest organic electron acceptors to have found wide use in organic devices, and forms a strongly bonded donor-acceptor complex with tetrathiafulvalene (TTF). Thus, we employed a model system of BTDA-TCNQ, which integrates the structural properties of both TCNQ and TTF in a single molecule, for realizing self-organization into an ordered domain. BTDA-TCNQ is a TCNQ derivative fused with 1,2,5-thiadiazole

rings, exerting strong intermolecular interactions in a planar fashion to form network structures in the single crystal [4] and even in its charge-transfer crystals [5]. The rhombic structure of BTDA-TCNQ exhibits two-fold symmetry with two mirror planes, allowing perpendicular alignment of two electrostatically opposite symmetry axes consisting of electronegative and electropositive end groups, respectively. It, therefore, enables equivalent intermolecular interactions along the four sides of the molecule. Such rhombic structure also facilitates access of neighboring molecules to each other via high electrostatic interactions in the four directions, which leads to topographically favorable intermolecular interactions. The strong non-bonding intermolecular interactions, balanced with surface-molecule interfacial interactions and site-specific rearrangements of the BTDA-TCNQ molecules near surface step edges, enable the “step-flow” growth mode for the supramolecular carpet formation. This can lead to an extension of the supramolecular carpet over step edges of the Au surface without loss of its structural integrity, and results in a covering with high interfacial uniformity over multiple surface steps and terraces, even on the pre-annealed amorphous Au surface prepared on a glass substrate. In addition, different types and dimensionalities of the interfacial electronic structures are distinctively observed in the supramolecular carpet of BTDA-TCNQ on the Au(111) surface, corresponding to the energy region and the local position of the system, implying that various types of electronic structures projected onto the supramolecular carpet can be selectively accessible. These results suggest that the supramolecular carpet has great potential for applications in organic electronics, and also provide important guidelines to develop novel materials forming seamless organic thin films on various surfaces.

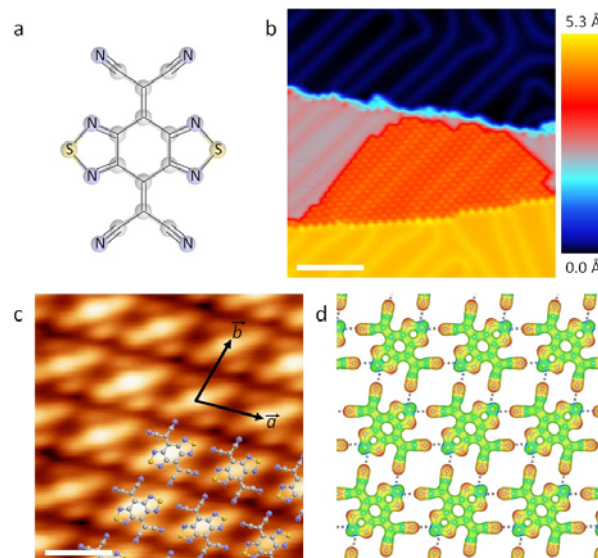


Figure 1. (a) The chemical structure of BTDA-TCNQ. (b) STM image of BTDA-TCNQ/Au(111), which shows that the molecular network of BTDA-TCNQ grows from the step edge at the lower terrace (sample bias voltage (V_s) = 1000 mV, tunneling current (I_t) = 1.00 nA, scale bar (S) = 10.0 nm). Height scale is indicated in color. (c) Close-up STM image of the network structure formed by BTDA-TCNQ (V_s = 2000 mV, I_t = 1.0 nA, S = 1.0 nm). (d) The electrostatic potential map of the BTDA-TCNQ network. Blue to red corresponds to positive to negative charges. The distance for the S-N contacts (indicated by grey dotted lines) is 2.80 Å, and the calculated binding energy is ~0.70 eV per molecule.

[Reference]

1. C. D. Dimitrakopoulos & P. R. L. Malenfant, *Adv. Mater.* **14**, 99 (2002).
2. S. R. Forrest, *Chem. Rev.* **97**, 1793 (1997).
3. D. E. Hooks, T. Fritz & M. D. Ward, *Adv. Mater.* **13**, 227 (2001).
4. Y. Yamashita, T. Suzuki, T. Mukai & G. Saito, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1044 (1985).
5. T. Suzuki, T. Fukushima, Y. Yamashita & T. Miyashi, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 2793 (1994).

Desorption of CO from individual single ruthenium porphyrin molecules on a copper surface by inelastic tunneling process

Takuma Omiya^{1,2}, Heike Arnolds² Rasmita Raval² and Yousoo Kim¹

¹Surface and Interface Science Laboratory, RIKEN

² Surface Science Research Centre and Department of Chemistry, University of Liverpool

The formation/breakage of a metal-carbonyl bond makes it possible to control the electronic structure and physical properties of organometallic compounds. In particular, introducing carbon monoxide (CO) onto a metal atom at the centre of a metalloporphyrin provides additional versatility to its electronic and optical properties¹. For example, the coordination of CO onto ruthenium tetraphenyl porphyrin (RuTPP) increases its electronic excitation lifetime 1000 fold by switching the lowest excited state from (d, π^*) to (π, π^*) state, leading to phosphorescence².

A scanning tunneling microscope (STM) is a versatile tool for investigating chemical reactions and motions of a single molecule either by imaging or by manipulating individual molecules. However, in contrast to CO on metal surfaces, only a few comparable studies have been made using tunneling electron injection to the organometallic molecule from the tip of an STM^{1,3,4}. Stróżecka *et al.* reported electric-field effect induced CO desorption from manganese phthalocyanine on Bi(110)⁴. The authors observed a sudden drop in the tunneling current (I_t) in the V_s range of 400–600 mV, which shows the threshold V_s increases linearly with the tip-sample distance. Meanwhile, energy transfer from the tunneling electrons to the Co-NO bond through the IET process was inferred to induce the desorption of NO from NO-CoTPP/Au(111)⁴. Interestingly, desorption of NO was observed as two-carrier process at 0.8 V while it alters to one-carrier process at 1.0 V. The proposed mechanism is vibrational ladder climbing of the Co-NO bond, where 1.0 V electrons are sufficient to lead to direct desorption, while two lower energy electrons need to arrive within the vibrational relaxation time to cause desorption⁴. Here, we present a single-molecule investigation of the desorption of CO from the CO-RuTPP on a Cu(110) using a combination of scanning tunneling spectroscopy (STS) and reaction yield measurements. The single-molecule study revealed a novel mechanism of CO desorption that is driven by IET with a two-carrier process.

CO-RuTPP and RuTPP molecules are indicated by solid and dotted lines in the STM images of Figs. 1a-b, respectively. The desorption yield Y was calculated from $Y = e/I\tau$, where e is the elementary charge, and τ is the average time required for desorption. The averaged values of $Y(V_s)$ were obtained from current trace by repeating this experiment 10 times at each V_s . The desorption yield was recorded in the range of $V_s = -1.075$ to -1.60 V, as shown in Fig. 1d. No CO desorption was seen in the vibrational energy region below 400 mV at 4.7 K or 77 K. Instead, we only observe an increase in the desorption probability at voltages below -1.1 V, followed by a plateau in the region of $V_s = -1.15$ to -1.45 V and an increase for higher bias voltages. Above about -1.2 V, signal levels were sufficiently high to measure the current dependency of the desorption yield Y (Fig. 1e). The slope of the double-log plot is the power n in the power-law dependence: $Y = I^n$, where $n = 2.1 \pm 0.2$, 2.3 ± 0.3 , and 1.8 ± 0.1 for $V_s = 1.25$, 1.40 , and 1.60 V, respectively. This power-law dependence on the applied current represents that the desorption process consists of a two-carrier process, regardless of the applied bias voltage, in the range of -1.25 to -1.60 V.

We can explain the increase in the desorption yield observed below -1 V and the subsequent plateau by the peak observed by STS (Fig1.c) around $V_s = -1.1$ V: while STS detects the LDOS at a specific V_s , the reaction yield reflects the integral over the same LDOS. The IET process is enhanced by the CO-RuTPP HOMO or the pure RuTPP HOMO. A second threshold is observed at -1.5 V and corresponds again to a two electron process.

Fig.1(d) shows that CO desorption from RuTPP on Cu(110) has been already observed to begin at $V_s = -1.075$ V. In contrast, CO desorption from a copper surface requires a bias voltage higher than 2.4 V⁵. This difference cannot be explained by different desorption barriers, because the CO desorption temperature of CO-RuTPP is 80 K higher than that of CO/Cu(110). The desorption mechanism of CO from a copper surface is electron injection to the unoccupied $2\pi^*$ state, which occurs in a single-electron process⁵.

Since our reaction thresholds are in the energy range of electronic excitations, we propose that the first hole excites CO-RuTPP to an electronically excited (positive ion) state. The second electron then leads to desorption by injecting a further hole. A single hole in the CO-RuTPP HOMO at -0.8 V would be unlikely to result in desorption: the HOMO of CO-metalloporphyrins is governed by the d_{xy} orbital which has little overlap with the orbitals of CO, while an efficient IET process would require the localization of the tunneling electrons at the target chemical bond. However, once a hole is injected in the CO-RuTPP or RuTPP HOMO, lower occupied states might become energetically accessible to the second hole. For example, HOMO-1 and HOMO-2 originate from the hybridization between metal d_{xz}/d_{yz} and CO π^* orbitals, which contribute to the bond strength of the centre metal-CO. Since these states contain the target chemical bond, their excitation could lead to relatively efficient desorption via vibrational excitation in analogy to desorption induced by electronic transition (DIET) or simply withdrawing electrons from bonding states to induce repulsive CO-Ru potential.

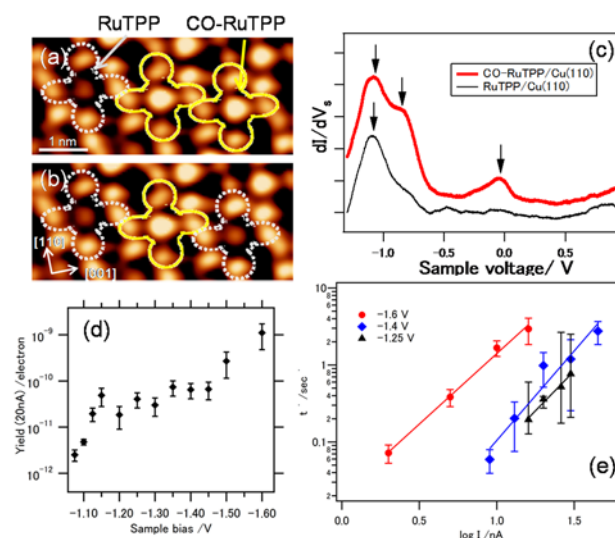


Figure 1 Schematic illustrations for the isomerization pathways and the potential energy diagrams. (a)–(b) STM images of CO-RuTPP adsorbed on Cu(110) ($V_s = 500$ mV, $I_t = 0.5$ nA) before and after injection of tunneling electrons to the rightmost CO-RuTPP molecule as pointed by an arrow. RuTPP and CO-RuTPP are marked by dotted and solid lines, respectively. (c) STS spectra of CO-RuTPP and RuTPP on Cu(110) surface. The STS spectrum of bare Cu(110) is subtracted to emphasize the change in dI/dV_s . (d) Reaction yield per electron for desorption of CO from CO-RuTPP/Cu(110) as a function of the sample bias voltage of the injected electrons. (e) CO desorption rate as a function of tunneling current for $V_s = -1.25$, -1.40 , and -1.60 V. The solid lines are the results of least squares fits to the data, whose slopes for the applied bias voltages correspond to powers (n) in the nonlinear power-law dependence. The error bars of (d) and (e) were determined from the standard deviation. The lower side of boundary of the error bar for -1.25 V in (e) is determined from the maximum desorption time.

【References】 1) W. Auwärter *et al.* Nat Chem, (2015), 7, 105-120. 2) L. M. A. Levine *et al.* JPC (1988), 92, 714-720. 3) A.

Stróżecka *et al.* PRL (2012), 109. 4) H. Kim *et al.* ACS Nano, (2015), 9, 7722-7728. 5) L. Bartels *et al.* PRL (1998), 80, 2004-2007.

副格子対称性が破れたグラフェンにおけるDirac準粒子： クラスタ近似による解析

関和弘¹, Qunfang Zhang², 柚木清司¹

理研・柚木計算物性物理¹, 塩城工学院²

2次元グラファイトシート、つまりグラフェンでは、フェルミ準位近傍での電子のエネルギー分散が運動量に比例する、質量ゼロの相対論的なディラック電子と同じエネルギー分散を示すことが知られている。さらに、この質量ゼロのディラック分散は、グラフェンにおける副格子対称性(単位胞当たりふたつの炭素があり、そのふたつの炭素の位置を入れ替える対称性)が本質的であることも明らかにされている。また、近年、我々は、炭素原子の電子間相互作用によってもディラック分散は本質的に影響を受けないことを報告した[1,2]。しかしながら、グラフェンの副格子対称性を破った場合、通常、質量ゼロのディラック分散は不安定である。この通説

に反して、最近、遷移金属表面上に

付着した副格子対称性が破れたグラフェンにおいて、図1に示すように質量ゼロのディラック分散が角度分解光電子分光実験で観測された[3]。

この起源を解明するために、我々は、Ni(111)表面上に付着した単層グラフェンに対する最も簡単なモデルを構築し、そのモデルに対してNiの3d電子間相互作用を有限サイズクラスタ内で厳密に扱えるクラスタ近似を用いて解析した。その結果、副格子対称性が破れているにもかかわらず、遷移金属の電子間相互作用によって質量ゼロのディラック準粒子が出現することが分かった[4]。

まず、モデルを構築するために図2に結晶構造の模式図を示す。STM実験[3]から、グラフェンはNi(111)表面ではAC stackingと呼ばれる構造で吸着しており、図2に示すように、B副格子炭素の真下にはNi(111)表面の一番上の層のNiがあり、一方、A副格子炭素の下には、Ni(111)表面の三番目の層のNiがある。つまり、グラフェンとNiの結合を考えたとき、B副格子炭素はNiと強く結合しているが、A副格子炭素とNiの結合は弱い。したがって、Ni(111)表面上のグラフェンは副格子

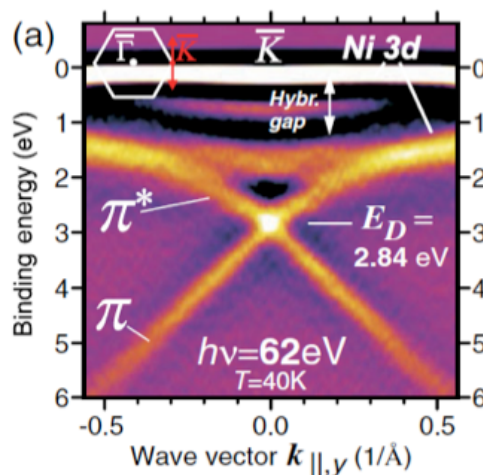


図1. Ni(111)表面上の単層グラフェンに対する角度分解光電子分光実験より得られたスペクトル(文献[3]より)。

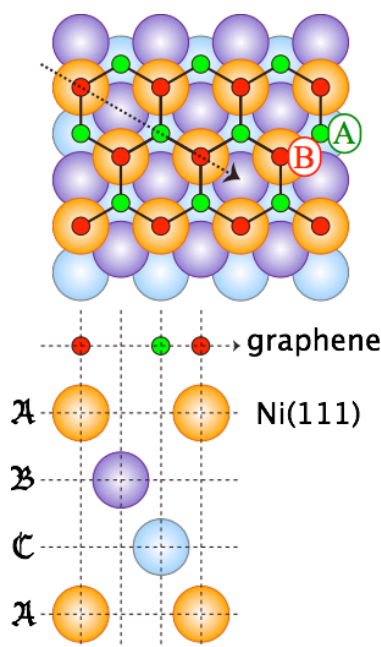


図2. Ni(111)表面上の単層グラフェンの結晶構造の模式図。上から見た構造(上図)と横から見た構造(下図)。

対称性が明らかに破れている（図3も参照）。

図3を見ると明らかなように、炭素の $2p_z$ 軌道とNiの結合を考えた場合、第一近似として、炭素の $2p_z$ 軌道はNiの $3d_z^2$ 軌道のみと結合しその他のNiの $3d$ 軌道とは結合しない。したがって、Ni(111)表面上の副対称性が破れたグラフェンの電子状態を記述する最も簡単なモデルは、炭素の $2p_z$ 軌道とNi(111)表面最上層にあるNiの $3d_z^2$ 軌道からなる周期的アンダーソン模型であることが分かる。つまり、この周期的アンダーソン模型では、伝導バンドが純粋グラフェンのディラックバンドであり、不純物軌道がNiの $3d_z^2$ 軌道でありそこでの電子間相互作用 U が考慮されている。

この周期的アンダーソン模型の一粒子励起を、一粒子近似を超えた範囲で理解するために、本研究ではクラスタ近似計算を行った[4]。クラスタ摂動理論および最も簡単なクラスタ近似であるHubbard-I近似の二通りの計算を行ったが、計算結果は本質的に同じであった。そこで、Hubbard-I近似の計算結果を図4に示す。まず、電子間相互作用がゼロの場合、フェルミエネルギー直上にフラットバンドが存在することがわかる。不純物軌道の電子間相互作用を有限にすると、そのフラットバンドがふたつにわかれエネルギー分散をもとこと、および波数が K と K' 点において質量ゼロのディラック準粒子が現れることがわかる。しかも、ディラック速度が電子間相互作用とともに大きくなっていることもわかる。つまり、我々の計算より、副格子対称性が破れたグラフェンにおいても電子間相互作用によって質量ゼロのディラック準粒子が誘起されることが明らかになった。

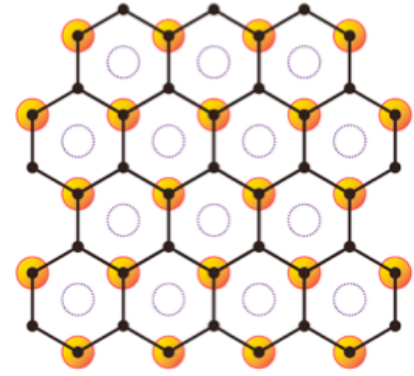


図3. グラフェンとNi(111)表面最上層の模式図（炭素原子は黒点、Ni原子はオレンジ丸）。見やすくするため第二層にあるNi原子も白丸で示してある。

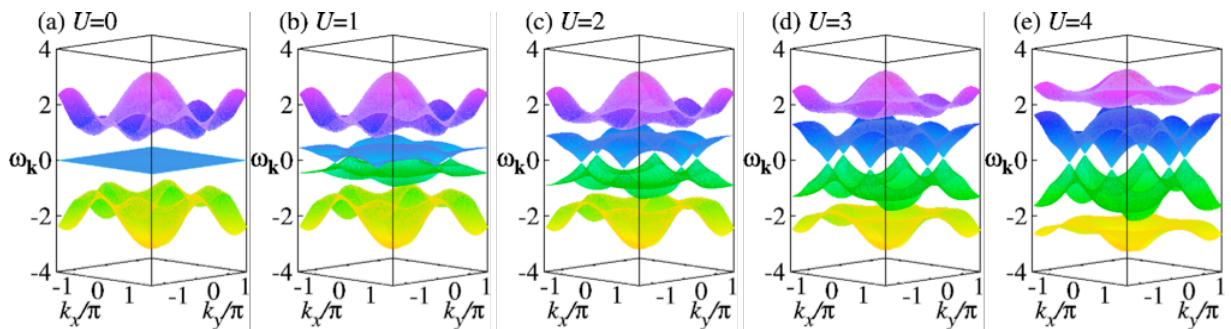


図4. 周期的アンダーソン模型に対するHubbard-I近似の計算により得られた一粒子励起分散[4]。(a)から(e)へと不純物軌道の電子間相互作用 U をゼロから増やしてある。エネルギー単位は最近接炭素間の飛び移り積分 t を取ってある。その他の模型のパラメータは、粒子-正孔対称なパラメータを選んでいる。フェルミエネルギーは $\omega_{\mathbf{k}}=0$ に対応している。

【参考文献】

- [1] Sorella, S.; Otsuka, Y.; Yunoki, S. *Sci. Rep.* **2012**, 2, 992 (2012). [2] Otsuka, Y.; Yunoki, S.; Sorella, S. *Phys. Rev. X* **2016**, to be published. [3] Varykhalov, A.; et al. *Phys. Rev. X* **2012**, 2, 041017. [4] Seki, K.; Shirakawa, T.; Zhang, Q.; Li, T.; Yunoki, Y. *Phys. Rev. B* **2016**, submitted.

Dirac Quasi-Particles in Sublattice Symmetry Broken Graphene:

Quantum Cluster Approximation Approaches

Kazuhiro Seki¹, Qingfang Zhang², Seiji Yunoki¹

Computational Condensed Matter Laboratory, RIKEN¹, Key Laboratory for Advanced Technology in

Environmental Protection of Jiangsu Province, Yancheng Institute of Technology²

In the two-dimensional graphite sheet, i.e., graphene, the electronic dispersion exhibits the massless Dirac dispersion with two Dirac cones at K and K' points, where the electronic dispersion is proportional to the momentum. It is well known that, in addition to time reversal symmetry and 120° rotational symmetry, the sublattice symmetry (or equivalently the inversion symmetry) is essential for the massless Dirac dispersions to be stable at K and K' points. We have also shown that the electron correlations do not essentially affect the massless Dirac dispersion of graphene

as long as the system is metallic [1,2]. However, against the common belief that the massless Dirac

dispersion is unstable against the violation of the sublattice symmetry, the recent angle resolved photoemission spectroscopy experiments have reveal the existence of the massless Dirac dispersion in a single layer graphene deposited onto Ni (111) surface [3], as shown in Fig. 1.

To understand the origin for this unexpected massless Dirac dispersion observed in graphene on Ni (111) surface, we have first constructed the simplest possible model for graphene on Ni (111) surface. To treat the electron correlation beyond the single-particle approximation, here we have adopted quantum cluster approximations which can treat the electron correlations exactly within small clusters and approximate the inter cluster coupling within the random phase approximation. We have found that the massless Dirac quasi-particles are induced by the electron correlations even when the sublattice symmetry of graphene is broken.

Figure 2 shows a schematic crystal structure of a single layer graphene on Ni (111) surface. From the STM experiments [3], the

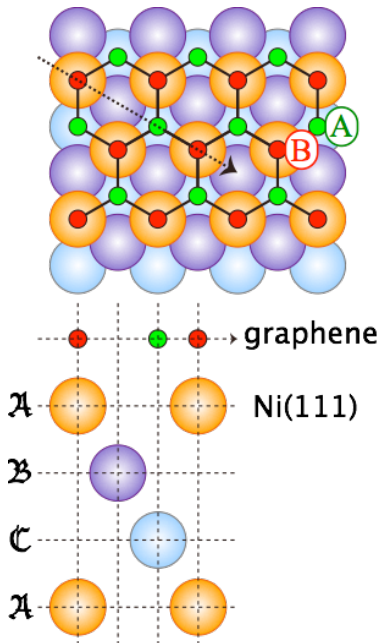


Figure 2. Schematic figure of the crystal structure for a single layer graphene on Ni (111) surface. Top view (upper panel) and side view (lower panel) are shown.

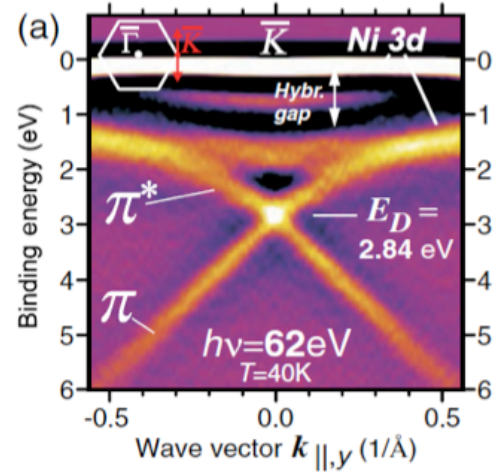


Figure 1. Angle resolved photoemission spectroscopy spectrum for a single layer graphene on Ni (111) surface (taken from Ref. [3]).

graphene is grown on the Ni (111) surface in the AC stacking, where the carbon atoms in B sublattice is placed exactly on top of the Ni atoms in the outmost layer, whereas the carbon atoms in A sublattice is located on the Ni atoms in the third layer. Therefore, the carbon atoms in B sublattice hybridize very strongly with the Ni atoms but the hybridization between the carbon atoms in A sublattice and the Ni atoms is weak, thus breaking the A-B sublattice symmetry of graphene.

As shown in Fig.3, the $2p_z$ orbital of the carbon atoms on B sublattice strongly hybridizes with Ni $3d_z^2$ orbital, but not with other 3d orbitals. Therefore, the simplest possible model to describe the electronic structure of the graphene is a half-depleted periodic Anderson model where the conduction band is the Dirac band of pure graphene and the impurity sites are represented by the Ni $3d_z^2$ orbitals where the local Coulomb interaction is included.

To examine the single-particle excitations of the half-depleted periodic Anderson model, we have employed the cluster perturbation theory and the Hubbard-I approximation, the simplest quantum cluster approximation. Since the results are qualitatively the same, we show only the results obtained by the Hubbard-I approximation in Fig. 4 [4]. When the local Coulomb interaction of the impurity sites is zero, there exists the flat band located exactly at the Fermi energy. Once the local Coulomb interaction is introduced, the flat band is split into the two bands and the massless Dirac quasi-particles emerges at K and K' points with the Dirac points located at the Fermi energy. It is also noticed that the Dirac Fermi velocity monotonically increases with increasing the local Coulomb interaction. Our results thus demonstrate that the massless quasi-particles are induced by the electron correlations even when the A-B sublattice symmetry is broken in graphene.

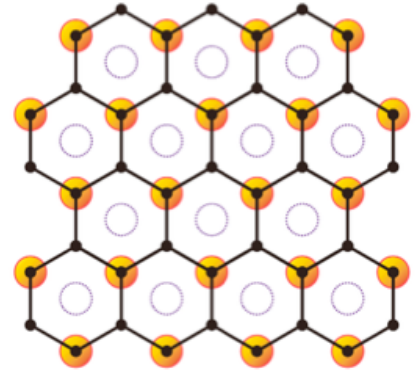


Figure 3. Schematic figure of graphene (solid dots) and the first layer of Ni atoms (orange circles). For clarity, the Ni atoms in the second layer are also indicated by open circles.

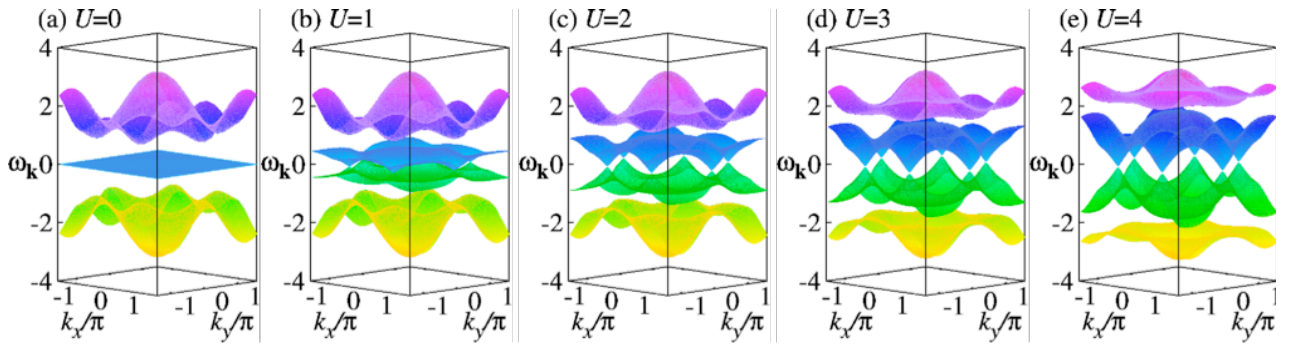


Figure 4. Single-particle excitation dispersions of the half-depleted periodic Anderson model obtained by the Hubbard-I approximation [4]. The local Coulomb interaction U is increased from (a) to (e), as indicated in the figures. The energy unit is taken as the nearest neighbor hopping t of the conduction sites. The other parameters are set so as to satisfy the particle-hole symmetry. The Fermi energy is located at $\omega_{\mathbf{k}}=0$.

- [1] Sorella, S.; Otsuka, Y.; Yunoki, S. *Sci. Rep.* **2012**, 2, 992 (2012). [2] Otsuka, Y.; Yunoki, S.; Sorella, S. *Phys. Rev. X* **2016**, to be published. [3] Varykhalov, A.; et al. *Phys. Rev. X* **2012**, 2, 041017. [4] Seki, K.; Shirakawa, T.; Zhang, Q.; Li, T.; Yunoki, Y. *Phys. Rev. B* **2016**, submitted.