

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### Ultrafast chiroptical spectroscopy and its application to biomolecular dynamics

(超高速キラル分光法の開発と生体分子ダイナミクスへの応用)

氏名 平松 光太郎

#### 1 序

円偏光二色性 (CD) 分光法やラマン光学活性 (ROA) 分光法などのキラル分光法では分子の絶対立体配置を区別して測定することができる。キラル分光法は、生体分子等の複雑な系に関して、通常の吸収/ラマンなどの手法と比べ豊富な構造情報を与えることが知られており、タンパク質の立体構造決定のための手法としても広く用いられてきた。今日では、定常状態にある分子に関しては、市販の装置を用いて CD, ROA スペクトルの測定が可能であり、様々な系のキラル分光測定が報告されている。一方で、フェムト秒からピコ秒程度の短寿命過渡種に関しては市販の装置を用いた測定は不可能であり、短パルスレーザーを用いた超高速時間分解キラル分光法の開発が必要となる。小分子の反応に比べ高い選択制や収率を示す生化学反応においてその 3 次元的構造が本質的役割を担っていることを考えると、時間分解キラル分光法は従来の時間分解分光法を凌駕する過渡種の構造情報を与えると期待される。しかしながら、キラル分光法はその信号強度の微弱さゆえ、短パルスレーザーを用いた測定が困難であり、これまでのところ少数の時間分解 CD 測定の報告があるのみである。

通常のキラル分光測定では、右回りと左回り円偏光を用いて吸収やラマンスペクトルを測定し、その差スペクトルとして CD や ROA スペクトルが得られる。このとき、バックグラウンドに対する信号強度は  $10^{-3}$  以下と微弱であり、安定性の劣るパルスレーザーを光源とした測定ではキラル由来の信号が背景信号の揺らぎに埋もれてしまう。この問題を避けるため、本研究では、直線偏光を入射光として用い、キラルサンプルを透過した光のうち入射偏光と垂直な電場成分の振幅と位相を検出する偏光敏感ヘテロダイン検出法を用いた時間分解 CD 分光や ROA 分光を開発した。それにより、既報を大きく上回る帯域・感度を有する超高速 CD 分光法を実現するとともに、パルスレーザーを光源とする ROA 測定に世界で初めて成功した。また、開発した時間分解 CD 分光法を用いて、アルブミンタンパク質に結合したビリルビン分子が、光励起後 10 ps 程度の時定数でキラル反転する様子を捉えることに成功した。本論文では第 2 章においてキラル分光法の基礎理論を述べた後、第 3 章以降で超高速キラル分光の開発と応用について以下のように記述した。

## 2 広帯域・高感度フェムト秒時間分解 CD 分光法の開発 (第3章)

これまでに開発されてきた時間分解 CD 分光法は測定領域が単一波長である、あるいは、多波長であるが感度が十分でないといった理由で、限定的な応用にとどまっていた。より多くの興味深い系で時間分解 CD 測定を行い、詳細な励起状態ダイナミクスの議論を実現するために、可視域全域 (400 - 720 nm) のマルチプレックス測定が可能で、かつ、従来の時間分解 CD 分光法を大きく上回る感度 ( $< 1$  mdeg) を有するフェムト秒時間分解 CD 分光法を開発した。

構築した時間分解 CD 分光計の概略を図 1 に示す。チタンサファイア再生増幅器 (785 nm, 100 fs, 1 kHz, 2 mJ) を光源に用い、第 2 高調波発生またはパラメトリック増幅などによって波長変換した光をポンプ光として用いた。一方、CD 測定には水で発生させたフェムト秒白色光を用いた。白色光をサンプルに入射するプローブ光と、プローブ光の位相測定のために用いるローカルオシレータ (LO) に分割し、プローブ光は Glan-Taylor 偏光子を用いて直線偏光としてサンプルに入射した。プローブ光はサンプル透過後、光学活性による直交偏光成分が発生し、入射光と同じ位相成分 (実部) には旋光分散 (ORD) 由来、 $\pm\pi/2$  だけ位相がずれた成分 (虚部) には CD 由来の電場が観測される。これらを区別して測定するために、サンプル透過光を LO と重ねあわせ、干渉分光法によって透過光の位相を決定することで、CD 及び ORD スペクトルを抽出した。

原理検証実験として  $\Delta$ -及び  $\Lambda$ -Ru(bpy) $_3^{2+}$  水溶液の定常状態および時間分解測定を行った。図 2(a,b) に開発した装置で測定した定常状態の CD 及び ORD スペクトルをそれぞれ示す。鏡像異性体からのスペクトルが逆符号を示しており、キラル敏感な測定が実現していることが確認できる。次に、Ru(bpy) $_3^{2+}$  水溶液に 393 nm のポンプ光パルス照射した 4 ps から 400 ps までの時間分解 CD/ORD スペクトルを図 2(c,d) に示す。時間分解 CD スペクトルにおいては、短波長側に見られる基底状態のブリーチ信号と長波長側に見られるブロードな励起種由来の CD 信号が測

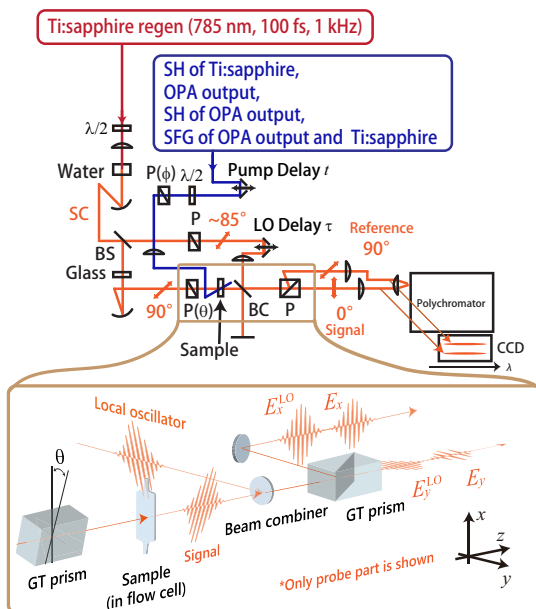


図 1 Experimental setup of the heterodyne-detected femtosecond TRCD spectrometer. BS: beam splitter, BC: beam combiner,  $\lambda/2$ : half wave plate, P: polarizer, PZT: piezoelectric stage

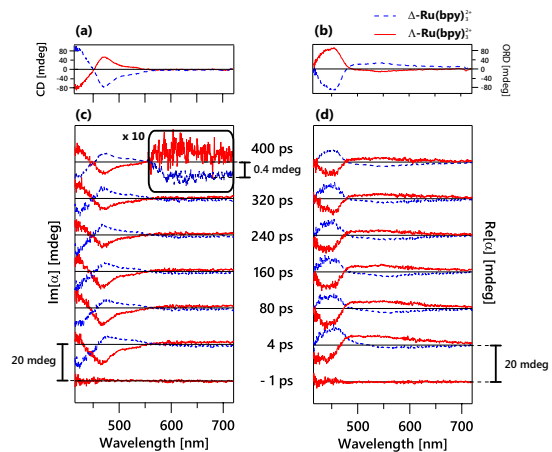


図 2 (a) CD and (b) ORD spectra of  $\Delta$ - and  $\Lambda$ -Ru(bpy) $_3^{2+}$  in the ground state obtained with our setup. (c) Imaginary and (d) real part of obtained time-resolved  $\alpha(\omega)$  spectra of Ru(bpy) $_3^{2+}$ . The exposure time was 30 min for each spectrum except for that of the  $\Delta$ -isomer at 400 ps delay time, which was obtained with 4 hours exposure time.

定され、この場合も鏡像異性体の測定では符号が反転することが確認された。励起種由来の CD 信号強度から、0.4 mdeg 以下の感度を達成していることが示された。

### 3 時間分解 CD 分光法による超高速キラル反転の観測 (第 4 章)

光受容タンパク質の機能発現を引き起こす発色団の光異性化反応や、光で駆動する分子モーターの動作においては、その反応途中で軸不斉のヘリシティーが反転していると予想される。本章では、そのようなキラル反転を伴う光化学反応の一例として bilirubin - human serum albumin (BR-HSA) 錯体の励起状態ダイナミクスを時間分解 CD 及び過渡吸収分光法を用いて研究した。図 3 に示すように、bilirubin は 2 つの dipyrinone 基からなる分子であり、その 2 面角によって CD の符号が変化する。BR-HSA 錯体においては溶液の pH が 4 付近、8 付近の場合に M-および P-conformer をそれぞれ形成し、CD 符号が反転することが知られている。本研究では pH=4.0 および 7.8 の場合に関して時間分解測定を行った。特に pH=4.0 の場合において、図 4 に示すように時間発展とともに励起状態の CD スペクトルが反転する様子が観測された。図 5 に示すような励起状態ダイナミクスのモデルに基づいて測定データを定量的に解析し、 $1/k_2$  で決まるキラル反転の時定数は 9.6 ps であると決定された。

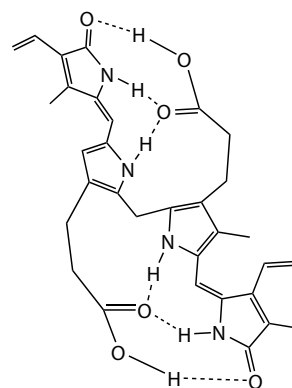


図 3 Molecular structure of bilirubin

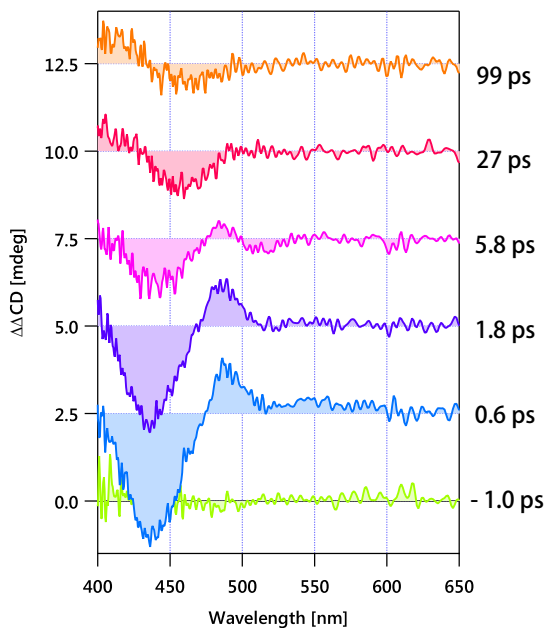


図 4 TRCD spectra of BR-HSA complex at pH=4.0 after subtracting the ground state bleach.

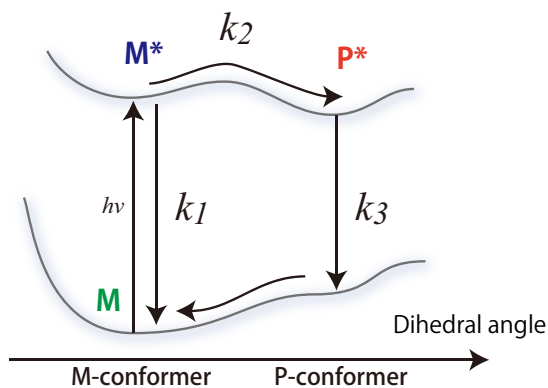


図 5 Model of the excited-state dynamics of BR-HSA complex

#### 4 コヒーレントラマン分光法による新規 ROA 測定手法の開発 (第 5-7 章)

ROA 分光法は分子の振動遷移を観測できるキラル分光法である。電子遷移を観測する CD に比べ、より詳細な構造情報が得られる一方で信号強度は 1 桁以上弱く、これまでに時間分解測定は全く実現していない。本研究では、コヒーレントアンチストークスラマン散乱 (CARS) を用いた新しい ROA 測定スキーム (CARS-ROA) を開発し、パルスレーザーを光原とする ROA 分光を実現した。CARS-ROA 分光法では直線偏光を入射光として用い、それらとは垂直な方向に発生する CARS 電場をヘテロダイン法によって位相敏感に測定する。本論文では、最適な ROA 測定手法の実現に向け、異なる入射光波長、位相検出スキームを検討した。第 5 章では近赤外光を用いたセルフヘテロダイン型の CARS-ROA 分光計の開発について述べた。セルフヘテロダイン検出では、図 6 に示すように、サンプルの後に配置する偏光子を直交配置から傾け、通常の CARS 電場を LO として用いる。偏光子の角度  $\theta$  が正、負の時に測定した CARS スペクトルの差を計算することで図 7(a) に示す (-)- $\beta$ -pinene の CARS-ROA スペクトルの測定に成功した。第 6 章ではアクティブヘテロダイン型の CARS-ROA 分光法の開発について述べた。アクティブヘテロダイン法は LO を外部参照物質で発生させてからビームスプリッターで信号光と重ねあわせる手法である。この場合はヘテロダイン信号が周波数領域の干渉縞として測定されるため、より背景信号に強い ROA 測定が可能となる。セルフヘテロダイン型に比べると SN 比は低かったが、ORD 由来の偽信号を定量的に排除できるなどの利点を有していた。第 7 章では第 5 章で開発した装置を可視光領域に拡張した。ROA の信号強度は入射光の周波数の 5 乗に比例するため、入射光の短波長化によって大幅な SN 比の改善が期待される。図 7(b) に可視光領域で測定した (-) および (+)- $\beta$ -pinene の CARS-ROA スペクトルを示す。近赤外領域で測定した図 7(a) のスペクトルと同じ露光時間で測定したものであるが、大幅な SN 比の改善が見られた。

本論文で報告した CARS-ROA 測定では定常状態の分子を対象としたが、今後、ポンプレーザーを導入することによって時間分解 ROA 測定へと応用が可能であると考えられる。

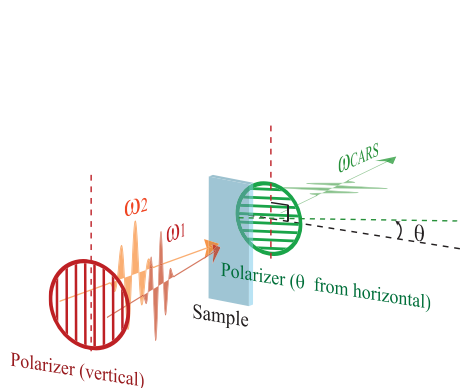


図 6 Schematics of the experimental configuration of the self-heterodyne CARS-ROA spectroscopy.  $\theta$  represents the angle of the analyzer from the perpendicular configuration.

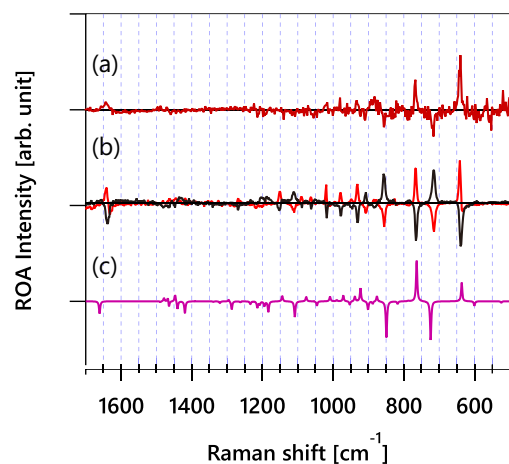


図 7 (a) CARS-ROA spectrum of (-)- $\beta$ -pinene observed by the near-infrared excitation with 1-hour exposure. (b) Observed CARS-ROA spectra of (+) and (-)- $\beta$ -pinene observed by the visible excitation with 1-hour exposure. (c) Calculated CARS-ROA spectrum of (-)- $\beta$ -pinene.