凝集状態のキラリティーを測定できる分光計の開発

東京理科大学研究推進機構総合研究院 黒田玲子

Reiko KURODA: Development of Chiroptical Spectrophotometers which can Measure Condensed Phases

Molecular chirality realizes strongly in the condensed phases (crystals, membranes, gels), however, it cannot be generally measured by commercially-available spectrophotometers due to strong macroscopic anisotropies. We have developed novel Universal Chiroptical Spectrophotometers, UCS-1~3, which overcome these problems. UCS-1 provides all optical characteristics. UCS-2/3 measure transmittance and Diffuse Reflectance CD, with vertical incident light and a horizontal sample stage, ideal for a droplet of solutions, loose powders or gel, to reveal structures and the dynamics of the transition processes. In this article, I shall describe the difficulty of solid-state chirality measurements, principles/outlines of UCSs and several examples of rich information obtained using UCSs.

1. はじめに

1.1 分子あるいはその集合体のキラリティー

靴のように鏡像対掌体(右の靴と左の靴の関係)が別であることをキラル, 靴下のように同じであることをアキラルという。キラルな性質をもつ物質があることが最初に発見されたのは水晶についてである。1812年, Biotが結晶面の出方が互いに鏡像対掌の右水晶と左水晶に直線偏光を当てたところ, 透過光の偏光面が右に回転(右旋性)あるいは左に回転(左旋性)した。その後, 液体状態でもキラリティーがあることが示され, キラリティーは分子の特性であることが判明した。キラル分光はもっぱら溶液状態の分子に関する研究を扱い, 分子の絶対構造や光学純度の簡便な判別手段として広く使われるようになった。一方で, キラリティーの発見が結晶でなされたにもかかわらず, 固体状態でのキラリティー研究は少数派となっていった。

1.2 何故凝集状態が重要なのか?

固体中で分子(本稿では原子・イオンも含めた広義の分子)は熱振動をしているもののその動きは液体, 気体と比べれば大幅に制限されており, 隣接した分子の影響を大きく受ける。このため, 固体状態の分子は溶液状態とは異なった構造をとったり, ユニークな化学反応を起こしたりする。また, 水晶 SiO_2 はSiとOから構成されておりキラルな分子は存在しないが, 原子の配列の仕方により, 結晶状態ではじめてキラリティーが現れる。一方で, タンパクと核酸がキラルであることを利用して, これら生体の基本物質の高次構造を溶液のキラリティーを使って調べることができるが, β -アミロイドのような

繊維を形成したタンパクの構造は凝集状態での構造を調べる必要がある。このように, アキラルあるいはキラルな構成要素(分子, イオン, 原子)のキラルな集合体のキラリティーの研究から, 溶液中の分子のキラリティーに勝るとも劣らない重要な知見が得られる。

分光測定は一般に溶液状態で行われ, 単結晶X線構造解析で得られた分子構造を参照するのが普通である。しかし, 前述のようにこの2つの状態で分子が同じ構造・挙動をとるとは必ずしも限らない。特にキラル分光は構造の違いに非常に敏感である。大学院生時代にこのことに気づき, 博士論文の研究テーマの半分はキラルな金属錯体の固体状態でのキラル分光測定に当てた。それから約45年間, 途中キラル分光研究に従事しなかった時期も一時あったが, 固体状態におけるキラル分光装置の開発, 測定方法の開発と応用の研究を行ってきた。研究対象は, 無機物質, 有機物質, 生体物質とすべてにわたり, 単結晶, 粉末結晶, 膜, ゲル状態での測定を可能にすることができた。本稿では, 凝集状態のキラル分光の問題点, それを解決できる装置の開発, 応用例について解説する。

2. 凝集状態のキラリティー測定

2.1 何故凝集状態の測定が困難なのか?

キラリティーは右回り, 左回りの円偏光に対する吸収係数の差であるCD(circular dichroism, 円二色性)を50 kHzの信号として観測する。後述するように, ストークスベクトル¹⁾とミューラー行列²⁾を用いた解析により

$$\begin{aligned} \text{Signal } 50 \text{ kHz} = & G_1(P_x^2 + P_y^2)[CD + 1/2(LD'LB - LDLB')] \\ & + G_1(P_x^2 - P_y^2)\sin 2\alpha(-LB\cos 2\theta + LB'\sin 2\theta) \end{aligned} \quad (1)$$

と、表される。³⁾ ここでLD, LBはそれぞれ(x-y)直線二色性(linear dichroism), (x-y)直線複屈折(linear birefringence), LD', LB'はそれぞれ(45°-135°)直線二色性, (45°-135°)直線複屈折, また P_x^2 , P_y^2 はそれぞれx, y軸に対する光電子増倍管(PM)の窓板の透過率で, aはx軸に関するPMの方位角, θ はサンプルの回転角である. 溶液のような均一な状態では, LD, LB, LD', LB'は0であるが, 固体状態のように本質的に巨視的異方性をもつ試料では, これらの値がCDの数百倍になることもある. 固体状態でユニークに現れるCDを測定するためには, 固体状態で測定する必要があるが, 巨視的異方性の項の存在を忘れ, 市販の分光計で測定した異方性によるシグナルを含んだスペクトルが報告されることもあり, 看過できない. 正しいスペクトルを得るには, 式(1)のCD以外の項を消去するか, CDシグナルのみを観測するようにするかの工夫が必要となる.

2.2 異方性を含まない測定が可能な試料

2.2.1 特殊な単結晶の測定^{4),5)}

等軸晶系の結晶軸(ただし4.2参照), あるいは正方晶系, 六方晶系のような単軸晶系の単軸に垂直な面では異方性がない. したがって, これらの結晶軸方向に円偏光を入射させると, 光路に垂直な面での異方性は0となり, 観測されるCDシグナルには異方性による偽のシグナルは含まれず, 正しいCDスペクトルが観測できる. しかし, 結晶内の分子の配向により, 許容される電子遷移の種類が限られることがある. 例えば, D3対称をもつCo(III)錯体の第一吸収帯領域でのd-電子エネルギーは, D3配位子場で $^1T_{1g}$ 軌道が 1A_2 と 1E 軌道(2重に縮退している)に分裂し, $^1A_1 \rightarrow ^1A_2$ および $^1A_1 \rightarrow ^1E$ 遷移となる. どちらも磁氣的に許容されるが, 電子的にはそれぞれC3軸に平行および垂直なときにのみ許容される. そこで, 分子のC3対称軸と六方晶系結晶のc軸が平行であれば, 結晶軸方向に円偏光を入射させることで, Eバンドのみが励起されることになる. その結果, バンドの帰属が行え, さらに, その旋光強度rotatory strength Rを求めることができるという大きな利点がある.⁴⁾⁻⁶⁾ 一般に, 大きな正と負のピーク(今の例では $^1A_1 \rightarrow ^1A_2$ と $^1A_1 \rightarrow ^1E$ 遷移)が近接して存在しているので, 分子がランダムに配向している溶液のCDスペクトルではそれらが打ち消しあった結果の一桁小さなピークとして観測される. CDスペクトルが分子構造に敏感なゆえでもある. 図1左に Λ -[Co(en)₃]Br₃·H₂Oの溶液状態と光軸方向の単結晶のCDスペクトルを示す.⁴⁾⁻⁶⁾ 溶液のCDは単結晶のEバンドよりも一桁小さいが(縦軸のスケールが溶液と結晶では異なる), 主成分のピークの符号は一致している. 一方, bis(tridentate)Co(III)錯体である[Co((2R-Me)-tacn)₂](ClO₄)₃の場合には(図1右), 溶液のCDスペクトルは単結晶と完全に逆符号で, あたかも絶対配置が逆転して

図1 (A) c軸方向に入射した単結晶と(B)その溶液のCDスペクトル. ((A) CD of a single crystal with radiation along the crystal c axis and (B) its solution CD.) (left): Λ -[Co(en)₃]Br₃·H₂O; (right): [Co(2R-Me)-tacn]₂(ClO₄)₃.

いるかのようである. この理由は, Co原子周りの配位子が正八面体場から大きく歪み極方向に配置しており, また, カウンターイオンとの相互作用により, Aバンドの強度が増大しているためであると説明される.^{6),7)}

2.2.2 粉末結晶^{4)-6),8),9)}

上に記したように, 特定の結晶系の特定の方向のときにのみ, 異方性によるシグナルを含まないCDが測定できる. しかし, 結晶を透過した光が十分な強度をもつように結晶を薄く磨くのは非常に困難である. さらに, 異方性を含まない単結晶の測定では許容される電子遷移が限られ, 一部の情報しか得られない. これらの問題を解決するためには, 粉末結晶のCDスペクトルを測定すればよいと着想した.^{4),5)} 誌面の関係で今回は詳しくは触れないが, 単結晶と粉末結晶(定量性が必要)のCDスペクトルと組み合わせる方法により, Co(III)錯体の $^1A_1 \rightarrow ^1A_2$ と $^1A_1 \rightarrow ^1E$ 遷移両方の帰属と旋光強度, 吸収帯波長を求めることに成功し, 理論計算との比較が可能となった.⁴⁾⁻⁷⁾

粉末結晶のCDを同じランダムに配向している溶液状態とのCDと比較すると, 溶媒の影響や隣接する分子の影響の情報が得られるので興味深い. そこで粉末結晶のCDをKBr discとnujol mullの両方で測定する方法を開発した.^{4),6),9)} 粒子が小さくなり分散が小さくなるのはKBr disc法である. 粒子の大きさ, disc生成時の圧力の影響が強度も含めたスペクトルに及ぼす影響を博士論文研究で調べた.⁴⁾ Discの作り方によっては異方性が生じる恐れがあるので, 後述のUCS分光計を使って後に再検討した.^{6),8)} 今では多くの人が当たり前に使うようになっている粉末結晶のCDのKBr discによる測定法を世界に先駆けて開拓したことをうれしく思っている.

3. 凝集状態の全光学的性質が測定できる分光計 UCSの開発

3.1 一般の凝集状態の測定が可能な分光計の開発

2.2では、特殊な晶系の単結晶あるいは一般の結晶の粉末結晶のCDスペクトルを測定する方法を取り扱った。しかし、凝集状態には膜、ゲルなどの状態もあるし、CD以外のLB, LD, CBにも、有用な知見が含まれている。そこで、液体状態はもとより、凝集状態全般におけるCD, CB (円複屈折 = ORD: Optical Rotatory Dispersion, 旋光分散), LD, LBのすべての光学的性質を測定できる分光計を設計・作製し、Universal Chiroptical Spectrophotometer, UCSと命名した。³⁾

3.2 測定装置 UCS-1の概要^{3),10)}

図2にわれわれの開発した装置, UCS-1のブロックダイアグラムを示す(装置は神藤福井大学教授(当時)と日本分光(株)との共同開発, 国内特許取得)。市販の装置

図2 UCS-1の (a) ブロックダイアグラム, (b) 装置概観, (c) 試料室とサンプルホルダー。(a) Block diagram, (b) outlook and (c) the sample housing/sample holder of UCS-1.)

からの代表的な改良点は,

- ① 50 kHz, 100 kHzの2つのロックインアンプを搭載し、両シグナルの同時測定が可能。
- ② 外部からの信号に基づき、任意の角度で試料を入射光路と直交する平面内で回転させてスペクトル取得が可能。そのための、試料回転ホルダーを作製。
- ③ 試料ホルダーは、試料回転ホルダーに自在に着脱可能。試料の表面側と裏面側に光照射可能。
- ④ 光変調器PEM (光弾性変調器) は、静的残留複屈折 α が約0.1度の良質のものを選択。
- ⑤ 検光子も回転可能。また、光路から離脱可能。
- ⑥ 検出器の光電子増倍管(PM)は、偏光特性が小さいものを選択。

3.2.1 測定の原理

偏光変調分光計のシグナルの解析や装置の性能評価に非常に有効なストークスペクトル¹⁾とミューラー行列²⁾を用いた。ストークスペクトル $S = [S_0, S_1, S_2, S_3]$ のパラメーターは、それぞれ、光の強度, 45°方向優先度, 右円偏光優先度, 水平方向優先度を示し、以下のように表される。

$$S_0 = P_{Ix}^2 + P_{Iy}^2 = I_x + I_y$$

$$S_1 = 2P_{Ix} \cdot P_{Iy} \cdot \cos \gamma$$

$$S_2 = 2P_{Ix} \cdot P_{Iy} \cdot \sin \gamma$$

$$S_3 = P_{Ix}^2 - P_{Iy}^2 = I_x - I_y$$

ここで, P_i , γ は、光の振幅と位相を表す。われわれのUCSで観測されるすべての偏光現象 (LB, LD, CD, CB) は、サンプルの検出器で検出される光の強度 I_d として、光電子増倍管D, サンプルS, 光偏光変調器M, 偏光子Pのミューラー行列の積として記述することができる。 I_0 は光源のストークスペクトルである。

$$\begin{aligned}
 I_d &= \hat{D} \cdot \hat{S} \cdot \hat{M} \cdot \hat{P} \cdot \hat{I}_0 \\
 &= 1/2 I_0 (P_x^2 + P_y^2) \{ 1 + 1/2 (LD'^2 + LD^2) + [CD + 1/2 (LD'LB - LB'LD)] \sin(\delta + \alpha) + (LD' \sin 2\theta - LD \cos 2\theta) \cos(\delta + \alpha) \} \\
 &\quad + 1/2 I_0 (P_x^2 - P_y^2) \sin 2\alpha \{ - (LD' \cos 2\theta - LD \sin 2\theta) + (LB' \sin 2\theta - LB \cos 2\theta) \sin(\delta + \alpha) + [-CB + 1/2 (LD^2 + LB^2 - LD'^2 - LB'^2) \sin 4\theta + (LD'LD + LB'LB) \cos 4\theta] \cos(\delta + \alpha) \} \\
 &\quad + 1/2 I_0 (P_x^2 - P_y^2) \cos 2\alpha \{ (LD' \sin 2\theta - LD \cos 2\theta) + (LB' \cos 2\theta - LB \sin 2\theta) \sin(\delta + \alpha) + [1 + 1/2 (LD'^2 + LB'^2) \sin^2 2\theta + 1/2 (LD^2 + LB^2) \cos^2 2\theta - 2 (LD'LD + LB'LB) \sin 4\theta] \cos(\delta + \alpha) \}
 \end{aligned} \quad (2)$$

式(2)中に現れてくる $\cos \delta$ と $\sin \delta$ をフーリエ級数として展開し、さらにわれわれの装置のPEMは静的残留複屈折 α が小さいために $\sin \alpha$ がかかっている項は無視できると、またPMの方位角 a を $\cos 2a \approx 0$ になるようにベースラインシフト調整でセットしているので $\cos 2a$ を含んで

いる項も除去できることを考慮に入れると、50 kHzに調節されたロックインアンプで検出されるシグナルは前出の式(1)となる。詳しくは文献3)を参照いただきたい。

同様に、ロックインアンプにより検出される光電流の100 kHz成分は

$$\begin{aligned} \text{Signal } 100 \text{ kHz} = & G_2 (P_x^2 + P_y^2) (LD' \sin 2\theta - LD \cos 2\theta) + \\ & G_2 \{ (P_x^2 - P_y^2) \sin 2a \} - CB + 1/2 (LD^2 + LB^2 - LD'^2 - LB'^2) \\ & \sin 4\theta + (LD'LD + LB'LB) \cos 4\theta \} \end{aligned} \quad (3)$$

ここで G_2 は100 kHzにおける分光計の感度に関する装置定数である。

サンプルとPMの間にPEMと同じ 45° の光軸で検光子Aを挿入した場合、ミューラー行列計算からPMで検出される光の強度 I_d は $I_d = \hat{D} \cdot \hat{A} \cdot \hat{S} \cdot \hat{M} \cdot \hat{P} \cdot \hat{I}_0$ で、上と同様の扱いで

$$\begin{aligned} \text{Signal } 50 \text{ kHz} = & G_3 \{ CD + 1/2 (LD'LB - LDLB') - LB \cos 2\theta + \\ & LB' \sin 2\theta \} \end{aligned} \quad (4)$$

G_3 は、検光子を挿入したときの50 kHzにおける分光計の感度に関する装置定数である。Aは検光子のミューラー行列を表す。また100 kHzシグナルも同様にして

$$\begin{aligned} \text{Signal } 100 \text{ kHz} = & G_4 \{ -LD' \sin 2\theta + LD \cos 2\theta + CB - 1/2 \\ & (LD^2 + LB^2 - LD'^2 - LB'^2) \sin 4\theta - (LDLD' + LBLB') \cos 4\theta \} \end{aligned} \quad (5)$$

G_4 は、検光子を挿入したときの100 kHzにおける分光計の感度に関する装置定数である。

式(1)が通常CD、式(3)がLD、式(4)がLB、式(5)がCBとして通常、観測に使われる信号である。

3.2.2 UCS-1 測定法の開発

固体サンプルのように大きなLB、LDが共存しているCD、CBを測定するためには、必要な信号のみを取り出し余分の項を消すことができる測定・解析方法が必要である。本稿では、CD測定についてのみ説明する。

式(1)には、試料の回転に依存する θ を含む項と含まない項がある。過去に、「試料を光の進行方向に垂直な面内で種々の角度に回転させてスペクトル測定を行い、それらを平均化すれば真のCDが得られる」という間違っただけの記述をした報文¹¹⁾があり、多くの研究がこの方法を踏襲して誤ったスペクトルを報じる結果となってしまった。しかし、回転に依存しない項があるので、これは正しくない。

われわれの測定法は、まず、吸収波長で試料を回転させてスペクトル(回転角依存スペクトル)を測定することで、LDとPEMの残留ひずみとのカップリング、PMの偏光特性とLBとのカップリングに起因する見かけのCD成分が存在するかを確認する。もちろん、サンプルが不均一であっても回転により値が変化するが、その場合には下記による補正はできない。試料による吸収波長で検光

子を入れSignal 100 kHzの試料回転角依存スペクトルを測定すると、式(5)から明らかなようにシグナルが $\cos 2\theta$ で変化すれば $LD > LB$ 、 $\sin 4\theta$ で変化すれば $LD < LB$ であることが示される。測定法の詳細は文献3)を参照していただきたい。検光子をいれ、試料を回転しながらLBの試料回転角依存スペクトルを測定し、 $LB_{\max}$ の位置を決める。そこから 45° 回転した位置では $LB = 0$ 、 $LB' = LB'_{\max}$ となるので、この位置でCDスペクトルを測ると、

$$[\text{appCD}]_{\text{face}} = G_1 \{ (P_x^2 + P_y^2) [CD - 1/2 LDLB'] + (P_x^2 - P_y^2) (\sin 2a LB') \} \quad (6)$$

試料の表裏を反転して波長スキャンをすると

$$[\text{appCD}]_{\text{back}} = G_1 \{ (P_x^2 + P_y^2) [CD + 1/2 LDLB'] + (P_x^2 - P_y^2) \sin 2a LB' \} \quad (7)$$

(6)と(7)を平均すると真のCDが得られる。

図3 UCS-2/3の(a)ブロックダイアグラム、(b)装置概観と透過CDとDRCDに対する入射光の進行方向。(a) Block diagram and (b) outlook with light path for transmittance CD and DRCD for UCS-2/3.)

3.3 測定装置 UCS-2/3の概要

さらに、試料を水平に置いて透過CDおよび拡散反射CDの両方の測定ができる装置、UCS-2,¹²⁾ UCS-3¹³⁾を開発した(国内特許取得)。装置のブロックダイアグラムを図3に示す。UCS-2およびUCS-3の特徴は、光をプリズムによって90°曲げて鉛直に走らせ、サンプルを水平に置くことができるようにしたことである。ともに透過CDおよび拡散反射CD(DRCD)を測定できる。UCS-2とUCS-3の違いは、UCS-3のほうが、拡散反射球を改良し感度を20倍とし、UCS-2では250~800 nmまでであった測定領域を190~800 nmまで短波長領域に広げるなど改善した点である。測定原理は上記のUCS-1とほぼ同じである。サンプルを水平に置くことで、粉末、ゲルなどサンプル保持に重力の影響を受けるもの *in situ* のキラリティー測定が可能となり、タンパク質が溶液から凝集する過程や粉末結晶が時間とともに結晶状態を保ちつつ変換していく現象の追跡など、リアルタイム測定を行うことができるようになったことである。驚くべき知見を得ることができた。具体例をいくつか4.で紹介する。

3.4 測定装置 UCSと測定方法の検証

Congo Redを吸着したポリビニルアルコール(PVA)フィルムはキラルではないが、強いCDを示す。これは

図4 Congo Redで染色したPVAフィルムの見かけのCD(表と裏)とその平均の真のCDスペクトル。(Apparent CD(face and back) of a PVA film dyed with Congo Red. The average of the two spectra gives true CD.)

図5 UCSで測定したAβ40のL-B膜の(a) CDと(b)CBおよび(c)Kramers-Kronig変換によるCBスペクトル。(Comparison of (a) true CD, (b) true CB and (c) CB calculated based on Kramers-Kronig relationship.)

すべて偽のピークである。サンプルが均一であれば強い異方性があっても、式(6)と(7)で表される試料の表、裏のスペクトルを測定するというわれわれの開発した測定法により、偽のスペクトルを除去できるはずである。図4に示したのがその一例で、表の見かけの強いCD、裏の見かけの強いCD、そして、それらの平均として得られる真のCDスペクトルが示されている。真のCDスペクトルは打ち消されてほぼゼロになっており、われわれの測定装置と解析方法の正しいことが裏づけられた。³⁾

また、異方性シグナルの混入しないCBスペクトルの測定法も開発したが、¹⁴⁾このようにして求めた真のCDとCBの間に吸収と分散のKramers-Kronigの関係が成り立つことを検証した。一例として、図5にアルツハイマー病の原因タンパクの1つであるβ-アミロイド40の18~20層積層したL-B膜(Langmuir-Blodgett)についての結果を示すが、良い一致を示している。¹⁴⁾

4. UCSでの測定例

UCS分光装置を用いて得られた知見の代表的例を以下に示す。有機物、無機物、生態関連物質、結晶、膜、ジェルと、多岐にわたる。

4.1 結晶中での光反応の追跡

8-Bromo-2-thioaryloxy-3-methylcyclohexen-1-one (1)は軸不斉をもつ化合物で、溶液中では単結合周りの回転が容易におきるために、キラルではない(図6a)。光環化反応を起こしてキラルな化合物2となるが、溶液反応ではラセミ混合物が得られる。しかし、(-)-(R,R)-(-)-trans-2,3-bis(hydroxy diphenyl methyl)-1,4-dioxaspiro-[4,4]nonane (3)と1:1のキラルな包摂結晶を作り、化合物1のキラリティーを左右の一方に固定して固体状態で光反応を行うと、ホスト化合物のキラリティーに依存して一方のエナンチオマーが多く生成される(図6a)。この反応の様子を結晶のCDスペクトルで追うと、ゲスト分子領域に等吸収点をもったスペクトルが得られた(図6b)。^{8),9)}包摂結晶を溶液に溶かせば、キラルなホスト分子による束縛がなくなり、化合物1はアキラルとなる。光路長の長いセルを用いても、化合物1のCDピークはこの領域にはまったく現れない(図6c)。固体状態でのCDスペクトルの強みを示す好例であろう。

4.2 等軸晶系結晶は本当に光学的に均質だろうか？

等軸晶系の結晶はどの方向からも光学的に均質であり、巨視的異方性がないと信じられてきた。しかし、キラルなクラスTに属する等軸晶系結晶には複屈折があることを、真のLB測定法を開発し、NaClO₃結晶を用いて初めて明らかにすることができた。¹⁵⁾[111]方向にはLBはないが、[100]方向では、図7に示すように、結晶の厚さに比例してLBを示す。しかも、われわれの手法で補正された真のLB値と厚さには、補正前のデータよりも

図6 (a) 1の溶液状態と、キラルなホスト3との包摂結晶の光環化反応スキーム。(b) 固相反応過程のCD/吸収スペクトル。(c) 包摂結晶の溶液のスペクトル。(a) Photocyclization scheme of compound 1 in solution and in chiral inclusion crystals.(b) Real-time measurement of CD and absorption spectra during the reaction.(c) Solution spectra of the inclusion crystals.)

きれいな直線関係が存在する (図7)。

4.3 固体状態でのポルフィリンの凝集

Zinc octaethylporphyrinはキラルなアミン, 1-cyclohexylethylamineと相互作用すると、見かけはまったく変わらないのに、固体状態であるにもかかわらず、ゆっくりとらせん状に凝集していくことが、KBr discのCD測定から明らか

図7 (100)面に平行に磨いたd-, l-NaClO₃結晶の250 nmでのLB値と厚さの関係。真および補正前のLB値。(True ((d)-(■) and (l)-(●)) and observed LB ((d)-(□) and (l)-(○)) at 250 nm against the thickness of sodium chlorate single crystals polished parallel to (100) face.)

図8 (a) 固体状態での Zinc octaethylporphyrinとキラルな1-cyclohexylethylamineの相互作用。(b) i) CDとii) 吸収スペクトルの時間変化。(Interactions of (a) Zinc octaethylporphyrin and chiral 1-cyclohexylethylamine in the solid-state.(b) Change of i) CD and ii) absorption spectra.)

になった。アミンのキラリティーに依存して逆のキラリティーを示す。その強度は4日間増大し続けた(図8).¹⁶⁾ 固体状態で分子が容易に再配列を起こすことを示す好例の1つである。

4.4 BSAタンパクのcast filmのCD

BSA (bovine serum albumin) はじめ多くのタンパク質が、BSE (牛海綿状脳症) を引き起こすプリオンタンパクのように、フィルム形成過程で β -シート構造の増加や分子の会合が起こり、構造が変化していると、HuらがCD分光測定から結論づけた。¹⁷⁾ しかし彼らは、固体状態における巨視的異方性がCDスペクトルに与える影響については考慮していなかった。そこで、BSAを例にとり、均質で透明なcast filmを作り、UCSを用いて測定した。われわれのスペクトルは溶液状態、膜状態ともに α -ヘリックス構造を示した(図9b)。Huらの報告は、巨視的異方

図9 BSAの溶液とフィルムのCDスペクトル。(a)不均質なfilmの見かけのCD。(b) UCS-1で測定した均質なfilmの真のCD。(Solution and film CD spectra of BSA. (a) Inhomogeneous films with macroscopic anisotropy. (b) A homogeneous film measured on UCS-1.)

図10 スズメバチシルクの膜に水蒸気を当てたときのCDの時間変化。(Time-course change of CD spectra during the exposure to steam on a hornet silk film.)

性とサンプルの不均一性からくる偽のシグナルに基づくことも、不均質なサンプルを作り、見掛けのCDスペクトルを測定して判明することができた(図9a).¹⁷⁾ 一方で、アルツハイマー病の原因タンパクの1つである β -アミロイドA β は、固体状態になると β -構造に変換することをUCS-1による測定で明らかにした。¹⁴⁾

4.5 スズメバチシルクの二次構造変化

スズメバチは蚕のように繭を作るが、その化学処理の仕方、膜、繊維、ジェル、粉末などさまざまな形態・強度のマテリアルとなる。透明な膜を作ることに成功し、その構造をUCS-1で観察した(図10)。サンプルを農業生物資源研究所の亀田博士から提供いただいた。驚くべきことに、この膜に5秒間水蒸気を当てるだけで、4つのサブユニットからなるシルクの α -ヘリックス構造の割合が増大した。さらに、5秒間水蒸気に当てる操作を繰り返したところ、合計85秒後にはcoiled coil構造に、合計140秒で β -構造に変換した。膜の見かけはまったく変わらない。湿気なしの加熱だけでは構造変換は起こらない。 β 構造はおそらく、crossed β 構造であろうと推定している。¹⁹⁾ 異方性による偽のシグナルが混入していないことも確認済である。膜状態で起きる容易なタンパクの二次構造変換が初めて明らかになった。この論文は国際専門誌Chiralityの本年(2018年)5月号の表紙を飾った。¹⁹⁾

4.6 gel内に固定された4重螺旋DNAの構造変化

GelのCDはこれまで報告例がなかったが、薄く透明なgelを作り、専用の石英板に挟むことでLD, LB, CD測定に初めて成功した。その結果、ここでも面白い知見を得ることができた(東大工学部吉田研究室秋元講師らとの共同研究)。²⁰⁾ PNIPAAm gelは25 ~ 55度という狭い温度範囲で、膨潤、収縮を繰り返す。このゲルの作る容器の中に、4重螺旋を作ることのできる塩基配列をもつsingle-strand DNAを膜につないだ形で入れておくと(図11a)、ゲルの熱変化に応じてDNAの4重螺旋構造が変化することがUCS-1によるCD測定で明らかになった(図11b)。変化はある程度反復可能である。²⁰⁾

4.7 アミロイドタンパクの凝集過程のダイナミクス

アミロイド β タンパク質(A β)は、膜貫通型タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質APPがN端の細胞外ドメインの、ある特定の箇所ですべて β セクレターゼによって切断され、次に、細胞膜内、膜貫通部分の端側で γ セクレターゼにより切断されることで産生され、細胞外に分泌される。 γ セクレターゼによりアミノ酸残基Valで終わる残基数40個のペプチドA β 40が生成されるのが普通であるが、家族性アルツハイマー病患者には、アミノ酸残基がさらに2個(Ile-Ala)伸びたところで切断されたA β 42が多く見られる。これらA β が脳内で凝集し、蓄積すると、神経細胞が変性し、神経細胞が脱落し、認知症になると考えられている。UCS-1による測定から、

図11 (a) 熱感受性ヒドロゲルPNIPAAm内に結合した単鎖DNAがゲルの膨潤/収縮に合わせて、4重螺旋構造をとる模式図。(b) DNA領域のCDスペクトルの温度変化。(a) A model of a single-stranded DNA tethered inside thermoresponsive hydrogel PINAAm adopts G-quadruplex structure depending on the temperature. (b) CD spectral changes of the gel in DNAabsorption region.)

Ab42はAb40よりもβシート構造の割合が増えていることが明らかになった。¹⁴⁾

さらに、垂直型CD分光計UCS-2を用いて、構造変化のダイナミクスを追跡した。溶液中ではAb40はα-ヘリックス構造をとっている。水溶液の液滴を水平な試料台に置き、それがゆっくりと乾いて膜を形成する過程で、タンパク質の高次構造がどのように変化していくかをリアルタイムで透過CDで追跡した。変化前のCDスペクトルは溶液のそれとよく似ている。図12に示したように、固定波長でフォトマル加電圧を測定していると、あるところで大きく変化するところがある。この後の短い時間にタンパク質はαヘリックス構造が中心のものからβシート構造が多い、凝集状態の構造に変わったことが明らかとなった。

4.8 電荷移動錯体の崩壊過程の追跡

ピレンPyrene (PYR)とパラベンゾキノン p-benzoquinone (Q) はともにアキラな有機化合物であるが、混合溶液から容易に濃い赤色に着色したキラな電荷移動錯体の結晶を生成する。²¹⁾ アキラな分子の結晶内の配置によるキラリティーであり、興味深い。空間群はP4₁あるいはP4₃で、単軸晶系に属するので、4回軸周りには異方性がなく、この軸方向のCD測定に問題は生じない。しかし、吸収係数が非常に大きく、結晶軸に垂直な薄い面を作るように磨くことは至難の技である。そこで、粉末結晶のCDを測定した。この結晶はQが昇華性で、室温

図12 (a) Ab40が溶液から膜になる過程での230 nmのCD, LD, HT値の時間変化と、(b) 対応した波長スキャンCDスペクトル。(a) CD, LD and HT value changes at 230 nm during the phase transition of Ab40 from solution to a film. (b) The corresponding wavelength scan CD spectra.)

図13 PYRとQが作る電荷移動錯体粉末結晶の時間変化粉末X線回折像と拡散反射CDスペクトル。(Time-course change of powder X-ray diffraction patterns and diffuse reflectance CD of the Charge-Transfer complex crystals made from PYR and Q.)

で放置しておく次第に色が消えていく。以前、Qが失われても結晶構造が壊れてアモルフォスになることなく成分結晶に戻ることを、ほかの電荷移動錯体で発見している。²²⁾ PYR-Q電荷移動錯体結晶においても、Qが昇華して行く過程でPYR分子が自然に再配列してPYR結晶に戻る。その変化の過程を粉末X線回折像と、UCS-3を用いたDRCDで追った(図13)。シャープな回折像が観測され、アモルフォス状態を経ずに、PYR結晶の回折像に戻った。粉末の拡散反射(DR)CDは、P4₁, P4₃に対して互いに鏡像対称のスペクトルを示すが、どちらも、時間の経過とともに強度を失っていき、24時間後、粉末X線回折像がPYR結晶のものになったときには強度が0となった。²¹⁾

このような知見は、固体状態のCD測定で初めて明らかになることである。粉末結晶のKBr disc作製中にマト

リックスと反応したり、粉碎過程で結晶系が変換したりする例をわれわれは見つけている。粉末結晶を水平試料台に置いてだけで *in situ* で測定できる DRCD は有用であると考えている。

5. おわりに

特別にデザインされた装置で、特殊な方法で測定すれば、巨視的異方性をもつ凝集状態の試料のキラリティーや構造変化のダイナミクスを明らかにすることができると。これはアルツハイマー病などの神経変性疾患、光学材料など幅広い応用が可能である。測定自体それほど難しいわけではなく、1970年代前半に考案した KBr disc 法による CD 測定のように、多くの人が凝集状態のキラリティー研究に使ってくれることを願っている。長年にわたる研究過程で多くの共同研究者に恵まれ、この場を借りて改めて謝意を表したい。

今回は得られたシグナルの中から、異方性によるシグナルを除去する UCS についてのみ解説した。われわれは、CD シグナルのみを観測にかけ、二次元検出器で観測するところで、m sec の桁で測定できる装置を開発中である。測定されたスペクトルは真のスペクトルで、演算処理も不要である（国内、米特許取得済）。今後、この装置も何とか発展させたいと願っている。

文 献

- 1) H. J. Mueller: *Opt. Soc. Am.* **38**, 661 (1948).
- 2) M. Born and E. Wolf: *Principles of Optics* 2nd ed, Chap 1, p.30, PERGAMON PRESS, Oxford (1964).
- 3) R. Kuroda, T. Harada and Y. Shindo: *Rev. Sci. Instr.* **72**, 3802 (2001).
- 4) R. Kuroda: Ph. D. thesis, Tokyo University (1975).
- 5) R. Kuroda and Y. Saito: *Bull. Chem. Soc. Japan* **49**, 433 (1976).
- 6) R. Kuroda: *Circular Dichroism: Principles and Applications*, Second Edition, ed. N. Berova, K. Nakanishi and R. W. Woody, Chapter 6, p.159, John Wiley & Sons, Inc. (2000).
- 7) A. F. Drake, R. Kuroda and S. F. Mason: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1095 (1979).
- 8) R. Kuroda and T. Honma: *Chirality* **12**, 269 (2000).

- 9) R. Kuroda: *Chiral Photochemistry*, ed. Y. Inoue, V. Ramamurthy, p.385, Marcel Dekker, Inc. (2004).
- 10) R. Kuroda: *NATO Science for Peace and Security Series - Engineering Crystallography: From Molecule to Crystal to Functional Form*, ed. K. J. Roberts, R. Docherty and R. Tamura, Chapter 24, p.395, Springer (2017).
- 11) M. J. B. Tuis-Schneider and M. F. Maestrer: *J. Mol. Biol.* 52521 (1970).
- 12) T. Harada, H. Hayakawa and R. Kuroda: *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 073103 (2008).
- 13) T. Harada T, Y. Miyoshi and R. Kuroda: *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 046101 (2009).
- 14) T. Harada and R. Kuroda: *Biopolymers* **95**, 127 (2011).
- 15) T. Harada, T. Sato and R. Kuroda: *Chem. Phys. Lett.* **413**, 445 (2005).
- 16) V. V. Borovkov, T. Harada, G. A. Hembury, Y. Inoue and R. Kuroda: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 1746 (2003).
- 17) H. Hu, Q. Li, H. Cheng and H. Du: *Biopolymers* **62**, 15 (2001).
- 18) T. Harada and R. Kuroda: *Chem. Lett.* **31**, 326 (2002).
- 19) R. Kuroda and T. Kameda: *Chirality*, **50**, 541 (2018). Journal cover
- 20) E. Hasuikae, A. M. Akimoto, R. Kuroda, K. Matsukawa, Y. Hirutac, H. Kanazawac and R. Yoshida: *Chem. Commun.* **53**, 3142 (2017).
- 21) N. Asano, T. Harada, T. Sato, N. Tajima and R. Kuroda: *Chem. Commun.* 899 (2009).
- 22) R. Kuroda, Y. Imai, and N. Tajima: *Chem. Commun.* 2848 (2002).
- 23) R. Kuroda and Y. Imai: *Mendeleev Comm.* (dedicated to Homochirality discovered by Louis Pasteur in 1848), 148 (2003).

プロフィール

黒田玲子 Reiko KURODA
東京理科大学研究推進機構総合研究院
Research Institute for Science and Technology, Tokyo
University of Science
〒278-8510 千葉県野田市山崎2641
2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278-8510, Japan
e-mail: rkuroda@rs.tus.ac.jp
最終学歴：東京大学理学系研究科博士課程
専門分野：化学、結晶学、分光学、発生物学
現在の研究テーマ：カイロモルフォロジー研究
巻貝の巻き型決定遺伝子の同定から決定機構の
解明；多形結晶間の固体状態での変換とキラリ
ティー転写；固体状態でのキラリティー分光測
定など