膜タンパク質研究への展開をめざした 部分フッ素化リン脂質膜の開発

Development of Partially Fluorinated Phospholipids for Biochemical and Biophysical Studies of Membrane Proteins

園山 正史

群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門

〒376-8515

群馬県桐生市天神町 1-5-1

Masashi SONOYAMA

Division of Molecular Science, Faculty of
Science and Technology, Gunma University

1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan

論文要旨：私たちは、膜タンパク質の構造・機能解析に用いる新しい化合物として、アシル鎖末端にパーフルオロアルキル (Rf , $\text{C}_n\text{F}_{2n+1}$) 基を含む部分フッ素化リン脂質を開発している。Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) の部分フッ素化アナログ分子として、種々の長さの Rf 基をアシル鎖末端に含む新規リン脂質群 Fn-DMPC ($n=2, 4, 6, 8$) を合成し、脂質膜のゲル-液晶相転移温度を調べたところ、 Rf 鎖長に顕著に依存した挙動が観測された。DMPC に比べて、 n が6より小さい場合は相転移温度が低下する一方、 $n=8$ に Rf 基を伸長すると相転移温度が 50°C 以上も劇的に上昇した。膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) を F4-DMPC リポソームに組み込んだ再構成膜では、DMPC の場合と異なり、ゲル相、液晶相のいずれにおいても、bR は天然紫膜類似の高次構造と機能サイクルを有することが示された。このことは、部分フッ素化リン脂質が膜タンパク質研究に有用であることを示していると考えられる。

Abstract: As possible materials for structural and functional characterization of membrane proteins *in vitro*, we have developed novel partially fluorinated phospholipids that are modified with the substitution of the terminal alkyl group in the myristoyl chains of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) by the perfluoroalkyl ($\text{C}_n\text{F}_{2n+1}$) group at different lengths. Differential scanning calorimetric (DSC) measurements were performed for the novel partially fluorinated phospholipids Fn-DMPC ($n=2,4,6,8$). DSC curves of Fn-DMPC suspension demonstrated that Fn-DMPC suspension has significant Rf chain length-dependent gel-to-liquid crystalline phase transition temperature (T_m): Fn-DMPC with the short Rf groups ($n=2,4,6$) has lower T_m than unfluorinated DMPC, while T_m dramatically elevated to $\sim 66^\circ\text{C}$ upon elongation of the Rf group to $n=8$. We have also investigated structural and functional properties of a photoreceptor membrane protein bacteriorhodopsin (bR) incorporated into F4-DMPC liposome. As the result, bR in F4-DMPC liposome adopts native-like higher order structure and photocycle both in the gel and the liquid crystalline phase, which is in stark contrast with phase transition-induced structural changes for bR in DMPC liposome. These experimental results suggest that partially fluorinated phospholipid is promising for biochemical and biophysical studies of membrane proteins.

Key words: perfluoroalkyl group, phospholipid, membrane protein, lipid bilayer, thermal properties

1 はじめに

情報伝達、エネルギー変換、物質輸送等の生体機能を担い、また創薬のターゲットの半数以上を占めることから、現代の生命科学研究における最も重要な研究対象の1つである膜タンパク質の研究において、両親媒性分子は必要不可欠な存在である。例えば、生体膜から膜タンパク質を抽出・可溶化するには界面活性剤が用いられ、さらに必要に応じて精製過程を経た膜タンパク質の構造や機能の解析は、再度人工的な脂質二分子膜に組み込むことにより行われることが一般的である。このように生命科学研究においても、界面活性剤やリン脂質といった両親媒性分子が非常に重要な役割を果たすが、文字通り膜に存在する膜タンパク質は、疎水性の膜を貫くドメインに加えて、膜の外側にある水溶性ドメインもあわせもつため、機能を保持した膜タンパク質の可溶化や人工膜への組み込みは一般的に容易ではなく、構造や機能が解明された膜タンパク質の数は非常に限られているのが現状である。そのため新しい両親媒性分子の開発は現代においても重要な研究課題であり、様々な試みがなされてきているが、アルキル基の全ての水素原子をフッ素原子に置換したパーフルオロアルキル (Rf) 基が際だった特徴を示す¹⁾ ことに着目し、アルキル基に部分的に Rf 基を導入した新しいフッ素化界面活性剤が注目を集めている²⁾。特にパーフルオロヘキシル基 (C_6F_{13}) を末端に導入した疎水鎖をもつ糖誘導体が極めて有効であることが近年報告されており、今後膜タンパク質研究の急速な進展をもたらす可能性を秘めていると考えられる²⁻⁷⁾。

一方 Rf 基を含むフッ素化リン脂質の生命科学に関係する研究については、Riess, Vierling らによる研究を契機とするドラッグデリバリーシステムへの応用を目指した 1990 年代の一連の研究⁸⁻¹³⁾ と、代表的な飽和リン脂質の 1 つである dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) のパルミトイル鎖末端のヘキシル基の水素原子を全フッ素化した F6-DPPC に関する Kumar らの研究¹⁴⁻¹⁶⁾ が報告されている。しかしながら、現代の生命科学研究における最も主要な研究対象の 1 つである膜タンパク質への展開を目指した研究報告は全くなされていない状況である。そこで私たちは、膜タンパク質の構造や機能の解析への応用を目指し、新規部分フッ素化リン脂質の開発を近年行っている。この研究の大きな特色は、新たに開発する Rf 鎖長の異なる新規部分フッ素化リン脂質群を対象として、系統的に脂質二分子膜の基本的な物理化学的性質を明らかにするとともに、構造や機能発現機構が明らかにされている高度好塩菌 *H. salinarum* 由来のバテクリオロドプシン (bR)¹⁷⁾ をプローブとして

用いることにより、膜タンパク質の機能場としての部分フッ素化リン脂質二分子膜の特徴を探ることである。本総説では、部分フッ素化リン脂質が秘めている興味深い性質をこれら両面からご報告する。

2 部分フッ素化リン脂質

部分フッ素化リン脂質とは、リン脂質の疎水鎖であるアシル鎖 (エステル型の場合) あるいはアルキル鎖 (エーテル型の場合) の末端部分に Rf 基を導入した分子のことであり、疎水鎖全体を Rf 基で置換していないことが特徴である。一般的に、アルキル基に比べて、剛直で分子断面積は大きく、疎水性、疎油性をもつと考えられている Rf 基を、リン脂質のアシル鎖あるいはアルキル鎖の末端に部分的に導入した部分フッ素化リン脂質は、アルキル鎖セグメントと Rf 鎖セグメントが結合したジブロック疎水鎖をもつ分子であり、その構造は模式的に Fig. 1 (a) のように表すことができる。

部分フッ素化リン脂質分子が集合して形成される脂質二分子膜の性質は、2 種類のブロックの組み合わせに大きく依存することは容易に想像できるが、系統的に研究された報告はほとんど見られない。そこでまず、一定の長さのアシル鎖をもつリン脂質において、Rf 鎖長の違いが脂質膜の物性や構造に及ぼす影響を系統的に調べることを目的として、Fig. 1 (b) に示す化学構造をもつ 2 種類の部分フッ素化リン脂質群、すなわち dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)、DPPC の部分フッ素化アナログ分子である Fn-DMPC および Fn-DPPC を開発している。合成法の詳細については紙面の都合で割愛するので参考文献をご覧ください¹⁸⁻²¹⁾。

3 部分フッ素化リン脂質の膜物性

膜タンパク質研究への展開にあたっては、脂質膜懸液の物性、とりわけ熱物性が重要である。水中の脂質二分子膜は、側方拡散により脂質分子の流動性が高い液晶相 (liquid disordered phase)、あるいは流動性が抑制されているゲル相 (solid ordered phase) のいずれかに一般的にあり、温度変化により相転移が誘起されることが知られている。膜タンパク質が脂質二分子膜中で高次構造を形成し、機能を発現するためには、リン脂質分子の化学構造に加えて、脂質二分子膜の相挙動が密接に関係しており、膜タンパク質への応用を考える上でリン脂質二分子膜の膜物性は極めて重要である。

私たちはまず、脂質膜のゲル-液晶相転移温度 (T_m) が 24℃ 付近にある DMPC を対象として、ミリストイル鎖の末端アルキル基を種々の長さの Rf 基に置換した部分フッ素化リン脂質群 Fn-DMPC ($n=2, 4, 6, 8$) を

Fig. 1 Schematic view of partially fluorinated phospholipid (a) and chemical structures of partially fluorinated dimyristoylphosphatidylcholine (Fn-DMPC) and dipalmitoylphosphatidylcholine (Fn-DPPC) (b).

新たに合成し、脂質膜懸濁液のゲル-液晶相転移挙動の解析を系統的に行った^{22, 23)}。Fig. 2 に示すように、Rf 鎖長に依存して顕著な T_m の変化が見られた。 $n=2, 4$ といった短い Rf 基をミリスチル鎖末端に導入した場合、DMPC に対して T_m が 20°C 余りも低下するのに対し、Rf 鎖長を $n=6$ に伸長すると、 $n=2, 4$ に比べて約 10°C の上昇が見られるものの、Rf 基を全く含まない DMPC よりも依然 T_m は低いことがわかった。これらのことは、同一鎖長のアシル鎖をもつリン脂質において、炭化水素ブロックの末端に短いフッ化炭素ブロックを結合させた疎水鎖をもつ部分フッ素化リン脂質が二分子膜

を形成すると、炭化水素ブロックのみからなる通常のリン脂質に比べて、分子間の相互作用が弱くなっていることを示している。その原因の1つは、炭化水素ブロックとフッ化炭素ブロックが異なる分子断面積を有するために、部分フッ素化リン脂質分子間のパッキングが粗になることであると考えられる。また、以下に示す F8-DMPC の結果を考慮すると、大きな分子断面積をもつフッ化炭素ブロック間の相互作用が、短い Rf 鎖長の場合には強くないことも一因であろう。

Rf 鎖長を $n=8$ にさらに伸長した F8-DMPC では、Fig. 2 に示すように、 T_m が劇的に変化した。 $n=6$ に比べて T_m が約 50°C も上昇し、 66°C 付近にゲル-液晶相転移が観測されたのである。F8-DMPC は DMPC よりも 40°C も高い T_m を示す。通常の炭化水素のみからなる飽和 diacylphosphatidylcholine 二分子膜の T_m はアシル鎖長に比例して上昇することが知られている^{24, 25)} が、F8-DMPC は、DMPC よりもアシル鎖長が炭素数で4コ長い distearoylphosphatidylcholine (DSPC) に匹敵する T_m 値を示している。F6-DMPC に対する F8-DMPC の化学構造の違いは、ミリスチル鎖のフッ化炭素ブロックが $(\text{CF}_2)_2$ 長く、炭化水素ブロックが $(\text{CH}_2)_2$ 短いことであり、一見、F6-DMPC と F8-DMPC に見られる T_m の顕著な違いを生じるにはわずかな差のように考えられる。F8-DMPC 脂質膜懸濁液の熱物性に見られるこの際だった特徴は、フッ化炭素ブロックの全長を考えると説明が可能であることが最近わかってきた。長谷川らが提案した Stratified Dipole Arrays (SDA) モデル²⁶⁾によると、もともと強い電気双極子モーメントを有する多数の C-F 結合が存在する Rf 鎖では、鎖長が $n=8$ よりも長くなると、周期性をもつらせん構造により双極子

Fig. 2 Phase-transition temperature of Fn-DMPC suspension as a function of the Rf chain length.

Fig. 3 Top view of bR trimers (PDB ID: 4oV0) (a), circular dichroism spectra of bR in the native purple membrane at 30°C (b), in F4-DMPC liposome at 2°C (solid line) and 30°C (dotted line) (c), and in DMPC liposome at 2°C (solid line) and 30°C (dotted line) (d).

が層状に配置されるため、双極子-双極子相互作用に基づく分子間相互作用が著しく強くなる。このモデルは、長さの異なる種々のRf基を含む部分フッ素化ミリスチン酸分子群の水面上単分子膜に関する表面圧-分子面積等温曲線や赤外反射吸収スペクトルの測定結果から強く支持されている²⁶⁾。水面上Fn-DMPC単分子膜の表面圧-分子面積等温曲線に対するRf鎖長依存性も同様の傾向を示している²³⁾ことから、二本鎖型のリン脂質分子においても、SDAモデルが概ね有効であると考えられる。

4 部分フッ素化リン脂質膜中の膜タンパク質の解析

膜タンパク質機能場としての部分フッ素化リン脂質膜の有効性を検討するため、膜タンパク質を組み込んだ再構成膜のモデル系に関する研究を行っている。モデル膜タンパク質としては、構造・機能の解析が十分に進んでおり、DMPCやDPPCといった合成脂質を用いた再構成膜に関する先行研究がある光受容膜タンパク質バテリオリオドロプシン (bR)¹⁷⁾を用いている。bRは高度好塩菌 *H. salinarum* の細胞膜にパッチ状に存在する紫膜に含まれる唯一の膜タンパク質であり、三量体を基本単位とする二次元結晶を形成している (Fig. 3 (a))。タンパク質分子内の発色団レチナールにより吸収される可視光

のエネルギーを利用して、吸収極大波長の異なる一連の機能中間体を経由後基底状態に戻る光サイクルを通して、細胞質側から細胞外側へプロトンを運ぶポンプ機能を発現する (Fig. 4 (a))。これまでにFn-DMPC (n=2, 4, 6, 8) のいずれの脂質膜へも、十分高い収率でbRを組み込んだ再構成膜が得られているが、本稿では、先行して研究を進めたF4-DMPC脂質のbR再構成膜に関する結果²⁷⁾について述べることにする。

天然紫膜中のbRの可視円二色性(CD)スペクトルは、530 nm付近の極大ピークと600 nm付近の極小ピークからなる特徴的なbipolarなパターンを示し、これはbRの三量体構造に起因すると一般的に考えられている (Fig. 3 (b))。bRをF4-DMPC脂質膜に組み込んだ再構成試料 (bR/F4-DMPC) のCDスペクトルは、ゲル相 (2°C)、液晶相 (30°C) のいずれにおいても、天然紫膜に類似したパターンを示し、また再構成試料のX線回折から求めた格子定数は天然紫膜によく一致したことから、再構成膜bR/F4-DMPC中のbR分子は、天然紫膜類似の三量体を基本とする二次元結晶構造を形成していることが示された (Fig. 3 (c))²⁷⁾。一方、bRをフッ素化していない通常のミリスチル鎖からなるDMPC脂質膜に組み込んだ再構成膜 (bR/DMPC) においては、Fig. 3 (d) に示すように、ゲル相にある膜中のbRは天

Fig. 4 Photocycle of bR (a), flush-induced transient absorption changes of bR in the native purple membrane at 5°C (b), in F4-DMPC liposome at 2°C (c), and in DMPC liposome at 5°C (d).

然状態に類似した可視 CD パターンを示すが、脂質膜の液晶相への転移に伴いブロードな正の単一ピークをもつパターンに大きく変化する²⁸⁻³⁰⁾。この CD スペクトル変化は三量体-単量体転移に由来すると考えられており、DMPC よりもアシル鎖長の長い DPPC や DSPC に組み込んだ bR も、同様の脂質膜相転移に伴う分子集合状態の変化を起こすことが報告されている³⁰⁾。したがって、液晶相においても天然紫膜類似の bR 三量体の保持を実現する部分フッ素化リン脂質 F4-DMPC は、膜タンパク質の高次構造形成に関して、Rf 基の導入に由来する際立った特徴を示していると言えるであろう。膜タンパク質 bR の高次構造解析を通して明らかになった F4-DMPC 脂質膜のこの興味深い特徴の起源は、二成分系 DMPC/F4-DMPC 混合膜の熱物性³¹⁾ や bR 組込時における分配挙動の解析結果³²⁾ に基づくと、高い疎水性を帯びている bR の膜貫通部位とパーフルオロブチル基を導入したアシル鎖の親和性が低いために、F4-DMPC 脂質膜中では bR 分子が自発的に会合するという考えがもっとも妥当であると考えられる。

さらに、bR/F4-DMPC の機能の特徴を調べるために、

レーザーフラッシュホトリシスの実験を行った。Fig. 4 (a) の光サイクルの図に示すように、bR は可視光により励起された後、吸収極大波長の異なる一連の機能中間体を経て基底状態に戻るため、532 nm のパルス光照射後、各中間体に特有な波長の吸光度の時間変化を観測することによって、それぞれの中間体の生成・減衰、基底状態の回復の様子を調べることができる。天然紫膜では、プロトンポンプ機能の鍵となる M 中間体が 0.1 ms オーダーで生成・1 ms オーダーで減衰の後、数十 ms で基底状態に回復する (Fig. 4 (b))。再構成膜のレーザーフラッシュ測定を行ったところ、bR/F4-DMPC では光サイクルが長くなっているものの M 中間体の生成・減衰を含め、天然紫膜に似たプロファイルを示している一方 (Fig. 4 (c))²⁷⁾、bR/DMPC は M 中間体の生成が極めて速いにもかかわらず著しく減衰が遅くなるという、天然紫膜とは大きく異なるプロファイルを示す (Fig. 4 (d))。したがって、bR/DMPC とは異なり、bR/F4-DMPC は天然紫膜類似の機能中間体を有することが示され、機能発現の側面からも、疎水鎖末端への Rf 基導入効果が再構成した膜タンパク質にあらわれたと言える。

5 まとめと今後の展望

Fn-DPPC に関する研究成果を含めて、疎水鎖末端に Rf 基を導入した部分フッ素化リン脂質膜は、Rf 基の長さに依存した興味深い特徴を示すことが明らかになって来た。n=6 より短い Rf 基の導入は脂質二分子膜のパッキングを乱し、ゲル-液晶相転移温度を下げる効果をもたらすことにより、部分フッ素化リン脂質を用いて、疎水鎖に不飽和結合を導入することなく生理的温度において液晶相にある脂質膜を調製することが可能となる。一方、n=8 より長い Rf 鎖を含む部分フッ素化リン脂質では劇的に二分子膜の熱安定性が高くなる。これまで新しく開発したいずれの部分フッ素化リン脂質膜へも bR の機能的再構成に成功しており、特に bR/F8-DMPC は、極めて熱安定性が高いことが知られている天然紫膜に匹敵する熱安定性を示す結果が得られつつある。また、部分フッ素化リン脂質と通常のリン脂質からなる混合脂質膜はそれぞれの脂質に富むドメインに強く相分離することから、膜タンパク質を一方の脂質膜ドメインに選択的に組み込むという戦略も有効であると考えられ、現在予備的な実験結果が得られつつある。Rf 基を導入したリン脂質の膜タンパク質研究への展開はまだ始まったばかりであるが、Rf 基の長さに強く依存した脂質膜の物性を巧みに利用することにより、フッ素化界面活性剤に続き、今後、部分フッ素化リン脂質も膜タンパク質の構造・機能解析に重要な役割を果たして行くと期待される。

最後に、筆者が群馬大学着任時に新たな研究テーマを模索するにあたり、フッ素化リン脂質の世界へ導いて頂き、また7年近くにわたり共同研究を行ってきた産業技術総合研究所・高木俊之博士にまず心からの御礼を申し上げる。また、脂質二分子膜に関する研究は、脂質生物物理学がご専門の群馬大学・高橋浩教授とともに展開しており、深く感謝申し上げます。本稿でご紹介した研究成果は、研究室第1期生の吉野賢氏の堅実な実験による成果に負うところが極めて大きく、この場を借りて謝意を表す。なお本研究は、学術振興会科学研究費補助金、文部科学省特別研究経費「エレメントイノベーション」、京都大学化学研究所拠点研究費の援助を受けて行った。

文 献

- 1) M. P. Krafft, J. G. Riess, *Chem. Rev.* **109**, 1714 (2009).
- 2) J. L. Popot, *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 737 (2010).
- 3) C. Breyton, F. Gabel, M. Abela, Y. Pierre, F. Lebaupain, G. Durand, J.-L. Popot, C. Ebel, B. Pucci, *Biophys. J.*, **97**, 1077 (2009).
- 4) P. Raychaudhuri, Q. Li, A. Mason, E. Mikhailova, A. J. Heron, H. Bayley, *Biochemistry*, **50**, 1599 (2011).
- 5) A. Kyrychenko, M. V. Rodnina, M. Vargas-Urbe, S. K. Sharma, G. Durand, B. Pucci, J.-L. Popot, A. S. Ladokhin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 1006 (2012).
- 6) D. Stoddart, M. Ayub, L. Höfler, P. Raychaudhuri, J. W. Klingelhoefer, G. Maglia, A. Heron, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 2425 (2014).
- 7) E. Frotcher, B. Danielczak, C. Vargas, A. Meister, G. Durand, S. Keller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 5069 (2015).
- 8) C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **30**, 567 (1991).
- 9) F. Frezard, C. Santaella, M. J. Montisci, P. Vierling, J. G. Riess, *Biochim. Biophys. Acta*, **1194**, 61 (1994).
- 10) F. Frezard, C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, *Biochim. Biophys. Acta*, **1192**, 61 (1994).
- 11) C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, T. Gulik-Krzywicki, A. Gulik, B. Monasse, *Biochim. Biophys. Acta*, **1190**, 25 (1994).
- 12) C. Santaella, P. Vierling, *Chem. Phys. Lipids*, **77**, 173 (1995).
- 13) J.-P. Rolland, C. Santaella, P. Vierling, *Chem. Phys. Lipids*, **79**, 71 (1996).
- 14) N. C. Yoder, D. Yüksel, L. Dafik, K. Kumar, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 576 (2006).
- 15) N. C. Yoder, V. Kalsani, S. Schuy, R. Vogel, A. Janshoff, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 9037 (2007).
- 16) S. Schuy, S. Faiss, N. C. Yoder, V. Kalsani, K. Kumar, A. Janshoff, R. Vogel, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 8250 (2008).
- 17) J. K. Lanyi, *Annu. Rev. Physiol.*, **66**, 665 (2004).
- 18) K. Takai, T. Takagi, T. Baba, T. Kanamori, *J. Fluorine Chem.*, **125**, 1959 (2004).
- 19) K. Takai, T. Takagi, T. Baba, T. Kanamori, *J. Fluorine Chem.*, **129**, 686 (2008).
- 20) 高木俊之, 高井克毅, 馬場照彦, 金森敏幸, 有機合成化学協会誌, **68**, 206 (2010).
- 21) T. Takagi, T. Kanamori, *J. Fluorine Chem.*, **132**, 427 (2011).
- 22) M. Yoshino, H. Takahashi, T. Takagi, T. Baba, K. Morita, H. Amii, T. Kanamori, M. Sonoyama, *Chem. Lett.*, **41**, 1495 (2012).
- 23) M. Sonoyama, T. Takagi, K. Morita, M. Horikoshi, M. Hashimoto, T. Yanagi, H. Takahashi, H. Amii, T. Shimoaka, T. Hasegawa, T. Kanamori, manuscript in preparation.
- 24) H. Takahashi, T. Hayakawa, M. Murate, P. Greimel, Y. Nagatsuka, T. Kobayashib, Y. Hirabayashi, *Chem. Phys. Lipids*, **165**, 197 (2012).
- 25) 上野聡, 高橋浩, 熱測定, **41**, 104 (2014).
- 26) T. Hasegawa, T. Shimoaka, N. Shioya, K. Morita, M. Sonoyama, T. Takagi, T. Kanamori, *ChemPlusChem*, **79**, 1421 (2014).
- 27) M. Yoshino, T. Kikukawa, H. Takahashi, T. Takagi, Y. Yokoyama, H. Amii, T. Baba, T. Kanamori, M. Sonoyama, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 5422 (2013).
- 28) M. P. Heyn, R. J. Cherry, N. A. Dencher, *Biochemistry*, **20**, 840 (1981).

- 29) M. Sonoyama, T. Kikukawa, Y. Yokoyama, M. Demura, N. Kamo, S. Mitaku, *Chem. Lett.*, **38**, 1134 (2009).
- 30) Y. Yokoyama, L. Negishi, T. Kitoh, M. Sonoyama, Y. Asami, S. Mitaku, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 15706 (2010).
- 31) H. Takahashi, M. Yoshino, T. Takagi, H. Amii, T. Baba, T. Kanamori, M. Sonoyama, *Chem. Phys. Lett.*, **559**, 107 (2013).
- 32) M. Yoshino, K. Kanayama, H. Takahashi, T. Kikukawa, T. Takagi, K. Morita, H. Amii, T. Kanamori, M. Sonoyama, submitted.