

高強度赤外光照射による新規物質創成と新規物性発現

永井正也^a・川瀬啓悟^b・入澤明典^b・加藤龍好^b・磯山悟朗^b

^a大阪大学大学院基礎工学研究科、^b大阪大学産業科学研究所

(背景と目的)

近年の超短パルスレーザー技術と非線形結晶を用いた波長変換技術の進歩に伴い、MV/cm 超の高強度テラヘルツ (THz) 光が容易に得られるようになった。この電場強度は物質中の内部電場 (数 MV/cm) に匹敵し、新しい電子の集団励起や AC 電場-物質結合状態の研究が盛んに行われている。一方で THz パルスは超短光パルスに比べて電場の半周期がピコ秒程度と長いことから、電子が電場によって効率よく古典的に加速される。これによって生じた結晶内のブロッホ振動や低閾電場での高次高調波発生が報告されている。

一方で、THz 周波数帯には誘電体のソフトモード、分子間振動など分子やイオンに関する様々な励起が存在する。これらを大振幅で駆動することで非熱的な解離や誘電体の分極制御などの可能性がある。しかし電子に比べてイオンや分子の質量が大きいため、さらに高強度の電場振幅が必要となる。

大阪大学産業科学研究所の量子ビーム施設では、レーザーベースの THz パルス光源よりもさらに高強度の電場が得られるピコ秒の自由電子レーザー (FEL) パルスを有している。FEL 光を集光した際の最大電場振幅は理想的な状況下で 10MV/cm に達する。マイクロパルスのパルス幅は 10ps 程度で、これは電子系にとっては電子-格子散乱よりも長い時定数であるが、格子系が熱緩和し形状変化をもたらす時定数よりも短い。したがって FEL 照射による電子状態の新しい制御法や赤外活性振動モードを直接駆動する新しい物質制御が期待できるのではないかと考えた。

そこで本研究では(1)損傷閾値が高いワイドギャップ半導体において高強度 FEL パルスを照射した際の応答を調べ、また(2)THz 領域の振動モードが同定されている二糖類に研究対象を絞り、高強度 THz パルスを照射した際の応答を調べた。

(研究方法)

実験は大阪大学産業科学研究所の量子ビーム科学研究施設における L-バンドの線形加速器をベースとした FEL を用いた。出力したマクロパルスの繰り返し周波数 5Hz、中心波長は最大出力が期待できる 80 μ m (4THz) に合わせ、マクロパルスの強度は最大で 20mJ である。マクロパルスは 27MHz の 108 ショットのマイクロパルスから構成されており、マイクロパルスのパルス幅は FEL 光源と同期した超短光パルスとの相関波形から 10ps と見積もられる。実験では f12.5mm の単焦点放物面光を用いてビームを集光して試料 (固体、液体など) に照射した。そして照射時の発光スペクトル測定および照射で飛散した粒子の赤外顕微光などを行った。

(結果および考察)

まず新しい電子励起に関する実証実験の試料として我々はワイドギャップ半導体である ZnO ペレット、4H-SiC 単結晶、6H-SiC 単結晶に注目し、これらに高強度 FEL 光を照射した際の応答を調べた。その結果、照射中には試料表面から高速に加速された電子が放出しそれが空気 (窒素や酸素) を励起した発光が見られた。しかし直接遷移型半導体である ZnO ではバンド端近傍 (3eV 付近) に酸素欠損に由来する発光が見られた。これは高強度電

場によって生じた Zennor 効果によって価電子帯の電子が伝導帯に励起されたことを示唆している。

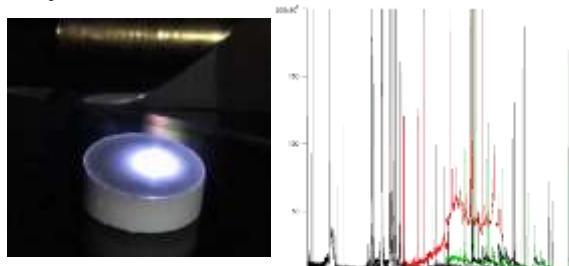


図 1 ZnO ペレットに照射した際の試料表面からの発光

一方我々は有機結晶に照射した際の応答も調べた。図 2 はラクトースの粉体に FEL 光を照射した際の結晶付近の写真を示す。2 糖類は THz 周波数帯の振動の同定がなされており、4 THz の FEL 光は分子間振動に共鳴している。FEL 光を照射するとある励起強度で粉体結晶がはじけるようにエアロゾルが生じる。分子間振動は有機結晶の体積膨張に直結する運動であり、大振幅で分子間振動が駆動されると、急激な体積膨張が生じる。これが分子脱離を引き起こすと考えられる。また高強度で励起すると、微結晶表面からの電子放出による空気の発光や C₂ ラジカルに起因する緑色発光が見られる (図 3)。この励起のメカニズムの照射は不明な点が多くあるものの、この励起強度では電子も THz-FEL 光によって大きく駆動されたと考えられる。

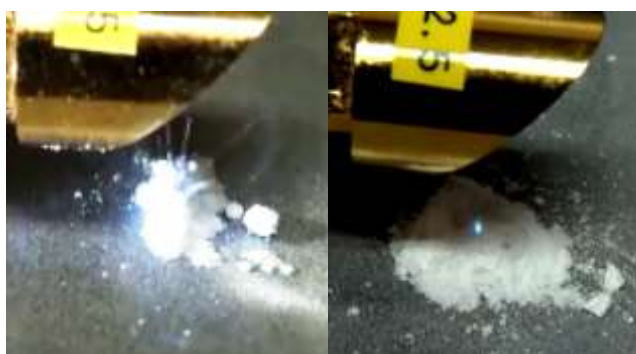


図 2 5 mJ (左)および 10 mJ/ macropulse (右)の 4THz の FEL 光をラクトース粉体に照射した際の様子。

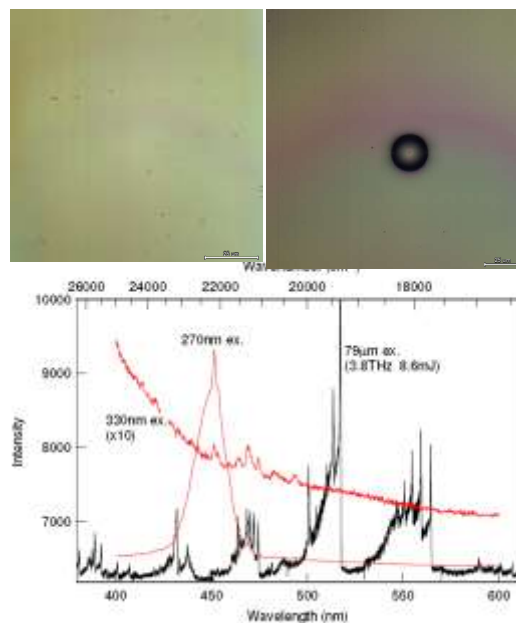


図 3 ショ糖単結晶表面から放出した飛散微粒子と発光スペクトル。C₂ ラジカルに由来する発光が見られる。

研究成果 (論文・学会発表・特許・受賞等)

論文 なし

学会発表

- M. Nagai, E. Matsubara, M. Ashida, K. Kawase, A. Irizawa, R. Kato and G. Isoyama, “Ablation Of Organic Crystals Using Picosecond THz Free Electron Laser Pulses,” The 39th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves (IRMMW-THz 2014) T4/E-16 (Tucson, Arizona, 2015 年 9 月)
- 永井正也, 松原英一, 芦田昌明, 冬木正紀, 川瀬啓悟, 入澤明典, 加藤龍好, 磯山悟朗, “高強度ピコ秒 THz 自由電子レーザーによる有機微結晶のアブレーション,” 日本物理学会 第 70 回年次大会 22pCN-6 (早稲田大学 2015 年 3 月 22 日)

特許 なし

受賞

- 日本赤外線学会 第 1 回研究奨励賞 (2014 年 5 月 23 日)

バイオナノカプセルを利用した新規抗炎症タンパク質の 生体内ピンポイントデリバリー

岡本一起^a・立松健司^b

^a聖マリアンナ医科大学、^b大阪大学産業科学研究所

(背景と目的)

炎症性転写因子 NF- κ B は炎症反応の中核的役割を担っている転写因子で、炎症反応に応じて、シクロオキシゲナーゼ (COX2) を含む多くの炎症関連遺伝子の転写を促進し、発現したタンパク質が炎症やストレス反応を増幅し、生体の炎症反応を賦活化する。ステロイド薬は、炎症の根元ともいえる NF- κ B を抑えることにより、その強力な抗炎症作用を発揮している。しかし、ステロイド薬は同時に炎症部位以外のところで、強力なグルココルチコイドホルモン作用を発揮する。これがステロイド薬の副作用である。

申請者が見いだした新しいタイプの核内受容体コアクティベーター (MTI-II) は、NF- κ B に直接作用して転写活性を抑制し (コリプレッサーとして働き)、ステロイド剤と同様に強力な抗炎症作用を示す [特許第 4874798 号 (JPN)、No.7,932,226 (US)]。MTI-II 自体にはホルモン作用がないので、ステロイド薬のような副作用がない。すなわち、MTI-II を利用すれば、ステロイド薬と同様に強力な副作用のない抗炎症剤となりうる。しかしながら、MTI-II は分子量 11.5 kDa の小さなタンパク質で、そのままでは細胞内に取り込まれない。

そこで、MTI-II を患部にだけ運び、細胞内に取り込ませるピンポイントデリバリーシス

テムを実用化できれば、副作用を少なくして、かつ強力に NF- κ B の働きを抑えることが可能である。本共同研究の目的は、(1) バイオナノカプセルを用いて、組織特異的に MTI-II を細胞内に取り込ませ、(2) それによりステロイド薬に代わる副作用のない強力な抗炎症剤を実用化することである。

これまでの研究で、MTI-II の抗炎症作用の作用中心となるアミノ酸領域 (40 アミノ酸残基より構成される中央部の酸性アミノ酸領域) を決定した。これは、化学合成できる長さであるが、バイオナノカプセルに取り込み易くするため (かつ化学合成し易くするため) には、さらに短くする必要がある。そこで本年度は、抗炎症作用中心となるアミノ酸領域を絞り込んだ。

(研究方法)

(1) 中央部酸性アミノ酸領域をさらに小さなペプチド (30 残基を 3 種類、20 残基を 5 種類、10 残基を 5 種類) に分割し、細胞内で発現するベクター (計 13 種) を構築した (図 1)。

(2) 次に、これらペプチドを HeLa 細胞で発現させ、NF- κ B の転写活性に対する阻害効果 (抗炎症効果) をルシフェラーゼアッセイと COX2 の誘導で検証した。

(結果および考察)

13種類のペプチド(30A-1~10A-5)の抗炎症作用を *in vitro* のルシフェラーゼアッセイで検証したが、NF- κ B の転写活性を阻害するものは20A-4と10A-3だけであった(図1)。

次にこれら2種類(20A-4と10A-3)のペプチドの抗炎症作用をルシフェラーゼ以外の内因性遺伝子の発現で確認する目的で、NF- κ B により誘導される COX2 と誘導されないグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH)の TNF α 刺激後の経時変化を解析した(図2)。

その結果、20A-4と10A-3はNF- κ B による COX2 の誘導を阻害するが、GAPDH 量には影響しないことがわかった。すなわち、20A-4と10A-3はNF- κ B の転写活性を阻害することが、内因性遺伝子でも確認できた。

これにより、MTI-IIの抗炎症作用中心をおよそ10アミノ酸残基の領域にまで絞り込むことが出来た(特許出願中)。これは、化学合成し易く、かつバイオナノカプセルに取り込み易い長さの抗炎症ペプチドである。今後、これらMTIペプチドを組み込んだバイオナノカプセルを非アルコール性脂肪肝モデル動物(肝炎から肝硬変、肝癌に移行するモデル動物)に投与して、ステロイド薬と同程度強力な抗炎症作用を発揮することと副作用が少ないことを *in vivo* で検証する。

研究成果(論文・学会発表・特許・受賞等)

学会発表

- ・岡本一起、表山和樹、佐藤利行、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、加藤智啓：第87回日本生化学会大会 2014年10月

特許

- ・特願 2014-257827, 出願日 平成 26 年 12 月 19 日, 名称 ペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、形質転換体、NF κ B 阻害剤、及び NF κ B 亢進性疾患の治療剤, 発明者 岡本一起

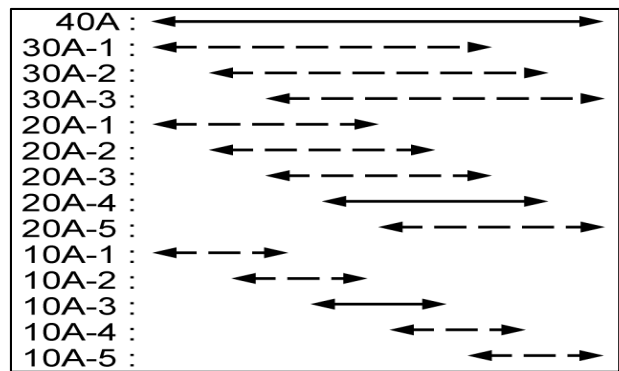


図1. MTI-II の抗炎症作用を持つアミノ酸領域(40アミノ酸残基、40A)と部分ペプチドの位置関係。

HeLa細胞に30A-1~10A-5の発現ベクターをトランスフェクトし、TNF α 添加後のNF- κ Bにより誘導されるルシフェラーゼ活性を測定した。ペプチド40Aと20A-4、10A-3(実線)にはルシフェラーゼアッセイで抗炎症作用が認められたが、その他のペプチド(破線)には認められなかった。

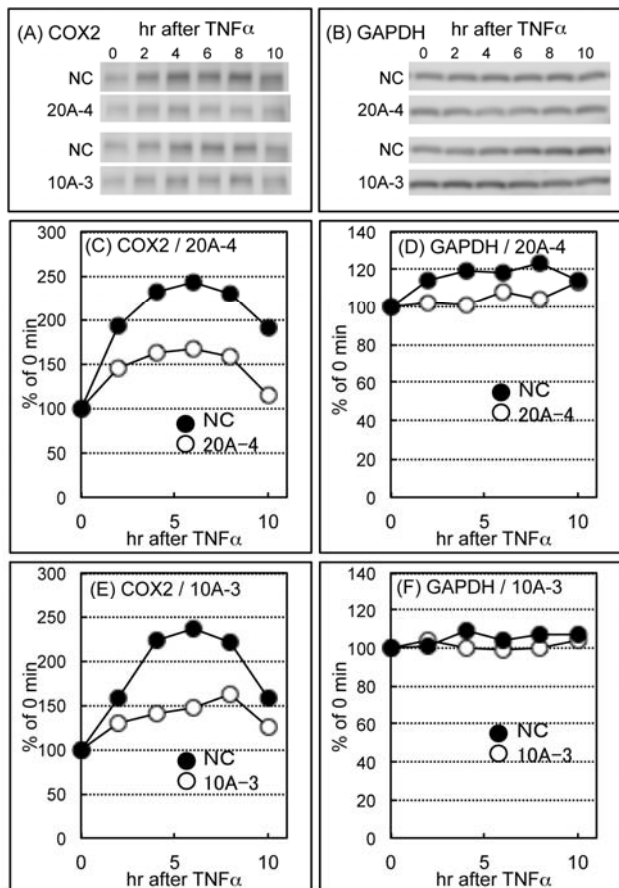


図2. MTIペプチド(20A-4と10A-3)を発現させたHeLa細胞でのCOX2の誘導の経時変化。

A, B: HeLa細胞にMock vector (NC)、20A-4、10A-3の発現ベクターをトランスフェクトし、TNF α 添加0~10時間後のCOX2とGAPDHの変化をウエスタンブロットで測定した。C, D, E, F: 各バンドのシグナル強度を測定し、0時間のシグナル強度を100%として、表示した。

Cytochrome b_{561} の構造と機能

阪大産研量子ビーム物質科学^a、神戸大院理^b

○小林一雄^{a*}、古澤孝弘^a、鏝木基成^{b**}

Structure and Mechanism of Transmembrane Cytochrome b_{561}

The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University^a, Department of Chemistry Graduate School of Science, Kobe University^b

Kazuo Kobayashi^a, Takahiro Kozawa^a, and Motonari Tsubaki^b

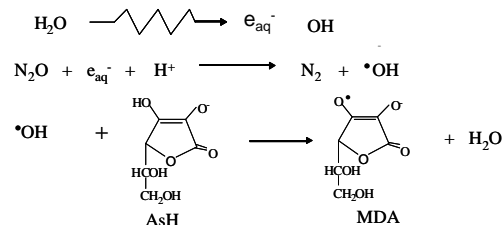
The ascorbate(AsH)-dependent oxidoreductase cytochrome b_{561} , a family of highly conserved transmembrane enzymes, plays an important role in the electron transfer from cytosolic AsH to intravesicular monodehydroascorbate radical (MDA). Radiolytically generated MDA oxidized rapidly the reduced form of cytochrome b_{561} to yield the oxidized form. Subsequently the oxidized form of cytochrome b_{561} was re-reduced by AsH in the medium. Recently, crystal structure of cytochrome b_{561} from *Arabidopsis thaliana* was reported. Here, the structural data and the effects of mutations allow the proposition of a general electron transfer mechanism for members of the cytochrome b_{561} family.

Cytochrome b_{561} はウシ副腎髄質クロマフィン小胞膜中において初めて発見された電子伝達タンパク質である¹⁾。この膜貫通型タンパク質は分子内に2つのheme b を持ち、細胞質側のhemeが細胞質内アスコルビン酸 (AsH)から電子を受け取って還元され、続いてタンパク質内電子伝達反応によって小胞内側のhemeが還元される。その後、小胞内側のmonodehydroascorbate radical (MDA)に電子を供与する事で、AsHを再生している。この神経型 b_{561} によく似たアミノ酸配列を有するタンパク質が動物の神経系以外の組織や植物にも広く分布発現している事が明らかになってきた^{2, 3)}。例えば、肺癌や乳癌を引き起こす遺伝子として同定されている領域中に存在している癌抑制遺伝子101F6⁴⁾、さらに線虫についても、その全ゲノム情報をもとにアミノ酸配列相同性から検索した結果、全部で7種類のファミリーが存在することが分かった。我々は、これまでにこれら生理機能に注目し、パルスラジオリシス法により生成させたMDAとの反応を追跡し、 b_{561} の2つのヘムのうち小胞内側に存在するヘム鉄のみがMDAと反応す

ることを明らかにした⁵⁾。

Cytochrome b_{561} 5~20 μ M, 10 mM AsHを含む N_2O 緩衝液にパルス照射すると、以下の式に従いMDAラジカルが生成し、MDAとcytochrome b_{561} との反応を追跡することができる。

この手法により、牛副腎髄質⁵⁾、トウモロコシ(Zea



mays)⁶⁾、癌抑制遺伝子産物101F6⁷⁾、Cecytoについてもパルスラオリシス法の手法により明らかにした。

最近シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の b_{561} の構造が明らかにされた⁸⁾。本研究では、 b_{561} の構造とこれまでのパルスラジオリシスの結果について議論する。

*K. Kobayashi, 06-6879-8502, kobayasiosaka-u.ac.jp, **M. Tsubaki, 078-803-6582 mtsubaki@kobe-u.ac.jp

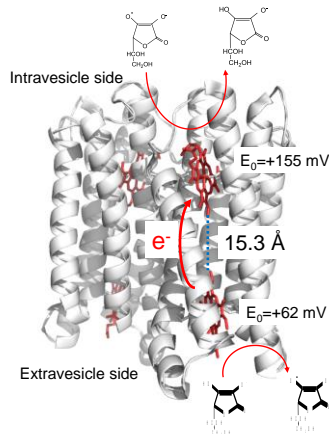


Fig. 1 Overall structure of cytochrome b_{561} . The structure was produced with PyMol using a structure from the Protein Data Bank (code 4O7G8).

cytochrome b_{561} の反応の中で注目すべき大きな特徴は15.3Å離れたヘム鉄間の電子移動過程である。この速度定数はFig.2で示すように秒オーダー観測され、牛副腎で

は4 s⁻¹で、トウモロコシでも同様の値が得られた。またこの過程がAsH⁺の濃度(5-30 mM)を変えて調べたところ、この速度は加えたAsH⁺の濃度に依存せず(Fig. 3(B))、またAsH⁺と酸化型 cytochrome b_{561} との速度と

比較して遅いことから、この過程はヘム間の電子移動を観測しており、分子内電子移動が律速に

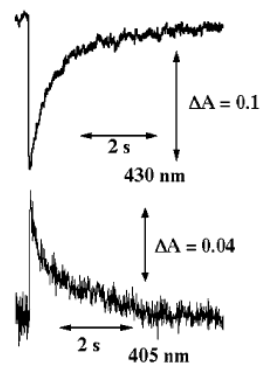


Fig. 2 Absorbance changes after pulse radiolysis of the reduced form of cytochrome b_{561} from bovine adrenal chromaffin in the presence of 5 mM AsH⁺ and N₂O at pH 7.0.

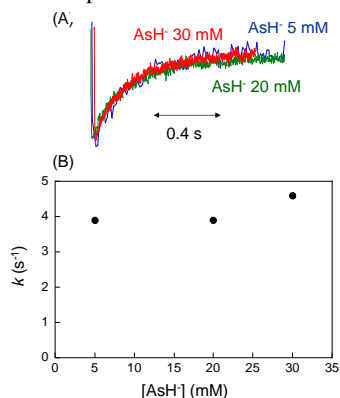


Fig.3 (A) Absorbance changes after pulse radiolysis of the reduced form of *Zea mays* cytochrome b_{561} in the presence of 10 mM AsH⁺ and N₂O at pH 7.0. (B) AsH⁺ concentration dependence on the rate constants of the reduction of cytochrome b_{561} .

なっていることが確かめられた。この速度定数は101F6や線虫におけるCe Cytb-2でも同様の値が得られた。このことは、これら b_{561} familyが同様の構造を持ち、同様の機構で電子が移動していると結論できる。

この15.3Å離れたヘム間の電子移動過程はthrough spaceの上限である14 Å⁹⁾より大きく、ヘム間に存在する水分子あるいはF129が関与していることが考えられる。また別のルートとしてFig. 4に示す保存性のアミノ酸残基および水素結合の存在が提唱されてお

り⁹⁾、今後これらアミノ酸残基の変異体を用いた実験が期待される。

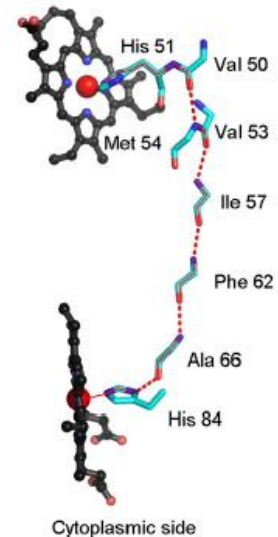


Fig. 4 The electron transfer pathway between the two heme groups⁸⁾.

References

- 1) D. Njus, J. Knoth, C. Cook, and P. M. Kelly, *J. Biol. Chem.* 258, 27-30 (1983)
- 2) C. P. Ponting, *Human Mol. Genet.* 10, 1853-1858 (2001)
- 3) H. Asard, M. Venken, R. Caubergs, W. Reijnders, F. L. Oltmann, and J. A. De Greef, *Plant Physiol.* 90, 1077-1083 (1989)
- 4) A. Bérczi, and H. Asard, *Biol. Szeged.* 52, 257-565 (2008)
- 5) K. Kobayashi, M. Tsubaki, and S. Tagawa, *J. Biol. Chem.* 273, 16038-16042 (1998)
- 6) N. Nakanishi, M. Rahman, Y. Sakamoto, T. Takigami, K. Kobayashi, H. Hori, T. Hase, P. Sam-Yong, and M. Tsubaki, *Biochemistry* 48, 10665-10678 (2009)
- 7) M. C. Recuenco, M. M. Rahman, F. Takeuchi, K. Kobayashi, and M. Tsubaki, *Biochemistry*, 52, 3660-3668 (2013)
- 8) P. Lu, D. Ma, C. Yan, X. Gong, M. Du, and Y. Shi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 1813-1818 (2014)
- 9) C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen, P. L. Dutton, *Nature* 402, 413-418 (1999)

高分子系飛跡検出器内の放射線損傷形成機構

山内知也^a・菅田義英^b・藤乗幸子^b・楠本多聞^a・田尾陽^a・池永龍一郎^a・安田修一郎^a

^a神戸大学大学院海事科学研究科、^b大阪大学産業科学研究所

(背景と目的)

高分子系飛跡検出器としてポリアリルジグリコールカーボネート (PADC) やビスフェノール A ポリカーボネート (PC)、ポリエチレンテレフタレート (PET)、ポリイミド (PI) を対象としてきた。PADC は高い検出感度を有するエッチング型飛跡検出器として知られており、10 MeV 程度のプロトンが検出できる。PC はアルファ線に対して、PET は数 MeV 程度の炭素イオンに対してようやく感度を持つ。PI系樹脂の検出閾値はさらに高く、Kapton はアルミニウム以上、UPILEX-S はアルゴン以上の重イオンのみを検出する。宇宙放射線やレーザー駆動イオン加速といった重イオンを含む混成場においては、種々の検出感度を有する多様な飛跡検出器が必要になっているが、分子構造と検出感度との関係について系統的な研究がほとんど行われおらず、必要な検出感度や閾値を有する新しい検出器を設計するための指針が与えられないままになっている。基礎的側面に目を向けても高分子に対する重イオン照射効果について分子構造のレベルで行われた系統的な研究は実は限られている。重イオンがもたらす照射効果はイオントラックの中心であるコア領域とそれを取り巻くハロー領域とで大きく異なり、それらを弁別して分析する必要がある。電子平衡条件

下にあるガンマ線照射では低エネルギー電子線の影響が大きくなるので、それとは別に高エネルギーのデルタ線が与える効果を模擬する必要があった。本研究は飛跡検出器として利用されてきている高分子材中に形成される放射線損傷の特性を理解するために行ったが、ほぼ単色の高エネルギー電子がもたらす照射効果を評価することを直接の目的としている。

(研究方法)

本研究では L バンドライナックを利用し、直径 2 mm 程度に絞った 28 MeV 電子線ビームを PET と PI 薄膜に直接照射した (ピーク電流 8 A、パルス幅 8 ns、繰り返し 20 pps)。吸収線量は CTA フィルム及び EGS コードを用いて評価した。照射前後の赤外線吸収スペクトルの変化から主鎖を形成するカルボニル基等の官能基の密度変化を、ランベルト・ベール則にしたがって評価した。赤外線吸収スペクトルに現れるピークの強度 (吸光度) は、着目する官能基のモル密度と試料厚さ、その官能基のモル吸光係数の積に比例するので、照射前後の吸光度の比 (相対吸光度) は、着目する官能基の減少割合を与える。実験的には相対吸光度を吸収線量の関数としてプロットして、その勾配から G 値が求められる。ビームスポットの中心だけを分析するために赤外顕微鏡 (IRT-5000Y, JASCO) を利用した。

(結果および考察)

図 1 に PET の電子線照射前後の赤外線吸収スペクトルを示す。エステル基を構成する C=O や C-O-C のピークが顕著に低下している。図 2 にカルボニル基の相対吸光度変化を吸収線量の関数として示す。PET 中の減少率は PC や PADC と比べて小さく、ここには飛跡検出器としての検出感度との相関関係が見られる。勾配から求めた G 値で比較すると、PADC の 8.5 や PC の 0.77 に対して PET のそれは 0.023 と小さな値である。

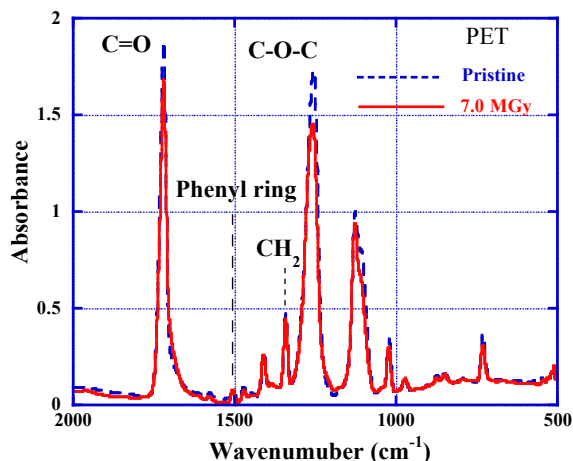


図 1 PET の赤外線吸収スペクトル (顕微)

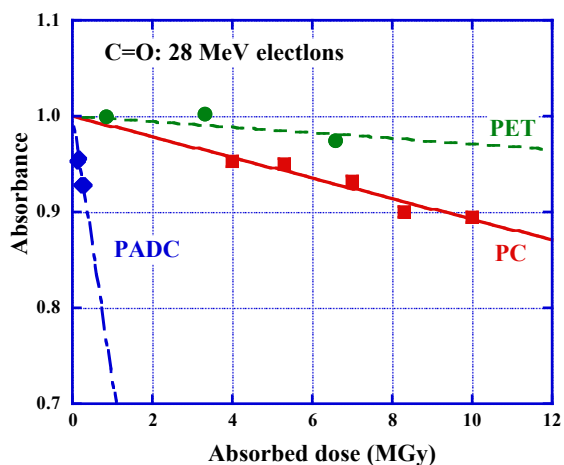


図 2 相対吸光度の吸収線量依存性

図 3 はカルボニル基損失の G 値を阻止能の関数としてプロットしたものである。He から Xe イオンまでの重イオンでは G 値は阻止能とともに増大する。ガンマ線と電子線は LET に対してプロットしており、前者は電子平衡条件での平均

値である。損傷形成に及ぼす低エネルギー電子の影響の大きさが示されている。

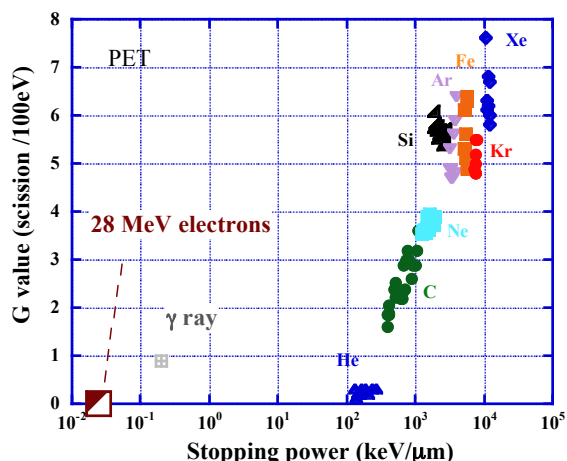


図 3 カルボニル基損失の G 値

研究成果 (論文・学会発表・特許・受賞等)

論文

- ・ポリイミド中重イオントラックの特性評価
松川兼也、山内知也、森豊、金崎真聡、又井悠里、楠本多聞、田尾陽、小田啓二、小平聡、小西輝昭、北村尚、放射線 39, 3, (2014) 135

学会発表

- ・ Feature of radiation damage formed along nuclear tracks in bisphenol A polycarbonate films, Ryunosuke Ikenaga, Yutaka Mori, Tamon Kusumoto, Keiji Oda, Satoshi Kodaira, Teruaki Konishi, Remi Barillon, Tomoya Yamauchi, 26th International Conference on Nuclear Tracks in Solids, September 2014
- ・ On the modified structure around the latent tracks in PADC films exposed to proton and heavy ions, Tamon Kusumoto, Yutaka Mori, Masato Kanasaki, Keiji Oda, Satoshi Kodaira, Remi Barillon, Tomoya Yamauchi, 26th International Conference on Nuclear Tracks in Solids, September 2014

特許

- ・なし

受賞

- ・なし