

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

◆ 記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		SHIN SHIK					
①研究代表者氏名		辛 埴		②所属研究機関・部局・職		東京大学・物性研究所・教授	
③研究課題名	和文	軟X線発光分光の開発とタンパク質、DNA等の生体物質の電子状態の研究					
	英文	Study on the electronic structure of biomaterials using a high efficiency soft x-ray emission spectrometer					
④研究経費		平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	総合計
18年度以降は内約額 金額単位：千円		25,800	24,800	8,900	7,900	5,700	73,100
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
辛 埴 小林 啓介	東京大学・物性研究所・教授 高輝度光科学研究センター・ 放射光研究所・主任研究員	放射光物性 放射光物性		放射光を用いた実験、解析、共同研究者との連絡 放射光を用いた測定機器の整備			
高田 恭孝	理化学研究所・放射光物性研究室・ 前任研究員	放射光物性		発光分光の整備、ビームラインの整備			
横谷 尚睦	岡山大学・大学院自然科学研究科・ 教授	光電子分光		生体物質の試料支持装置の整備			
原田 慈久	理化学研究所・量子材料研究グループ・ 連携研究員	放射光物性		生体物質の作成			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>軟X線を物質に照射すると、内殻正孔が生じる。軟X線発光分光は、その内殻正孔を埋める過程で生じる発光を測る実験手法である。軟X線発光分光には二つの大きな特色がある。一つは多元素からなる系においても特定の元素に局在した価電子の電子状態を観測できるということ、もう一つは光子過程のみであるために表面状態に鈍感であり、チャージアップの影響もないことから、光電子分光が苦手とする水を含んだ物質でも測定できるということである。そこで本研究では軟X線発光分光のこの特色を活かして、金属タンパク質やDNA等の水を含んだ生体物質を新しい機能性を持った物質として捉え、その電子状態を研究することによって生体物質の機能性を解明し、物質科学の新しい展開を図ることを目的とする。また、金属タンパク質中の遷移金属濃度は極めて薄いため、従来、固体試料の分析に用いてきたものよりも一桁以上検出効率が高く、固体用と同程度の高エネルギー分解能を持った軟X線発光分光器を開発する。</p> <p>近年のタンパク質の結晶化とその構造解析の進歩は著しく、次々に新しい重要なタンパク質の構造解析がなされつつある。そして構造解析の立場から、タンパク質の機能性解析の議論が始まっている。しかし、真の機能解析には電子状態の解明が本質的である。本研究では、光物性に基づいた物質科学の精密手法として、これらの物質との相性がよい軟X線発光分光を取り入れることによって、生体物質の機能性を解明する新しい研究分野を開拓する。金属タンパク質やDNAの電子状態を知ることにより、様々な応用研究に対する基礎物性を与えることが期待される。価電子帯においては、フェルミ準位付近の価電子帯トップ（HOMO準位）を観測することにより、DNAや金属タンパク質の電気的特性を明らかにすることができる。またHOMO状態はタンパク質に起きている化学（酵素）反応の詳細を明らかにすることにも適用される。一方で、内殻の研究では電荷移動や電子相関等の情報を得ることが期待される。このような試みは世界でも初めてである。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

発光分光器の開発や、それを用いたタンパク質などの軟X線発光測定など、当初計画で予定したことはほぼ達成しつつある。今後は装置の改善を行いながら、測定の精度を上げ、理論計算などの解析方法の確立を行う予定である。最終的には、タンパク質等の電子状態とその機能性について議論したい。

(1) 高分解能・高検出効率軟X線発光分光システムの開発

新規の斜入射平面結像型の軟X線発光分光器を設計・製作した。この分光器は、入射スリットを無くすことにより高検出効率を実現しながら SPring-8BLL17SU の微小スポット光を最大限利用して高エネルギー分解能をも達成することが出来る。(図1)。この分光器を用いた固体試料及び純水でのテスト実験において、約 1600(E/ΔE)のエネルギー分解能を達成した。これは現時点で軟X線領域における**世界最高の分解能**である。この分解能はスポットサイズを更に小さくすることと、検出器の位置分解能を改善することにより分解能を5000近くまで上げることが可能である。この分光器を用いて、次節のような生体物質からの微弱信号を観測することができた。一方、CCD検出器における検出効率の改善を行い、集光鏡等の工夫を行うと更に強度が1桁程度上がることと予想され、次年度では引き続き発光分光器の改善を行う予定である。

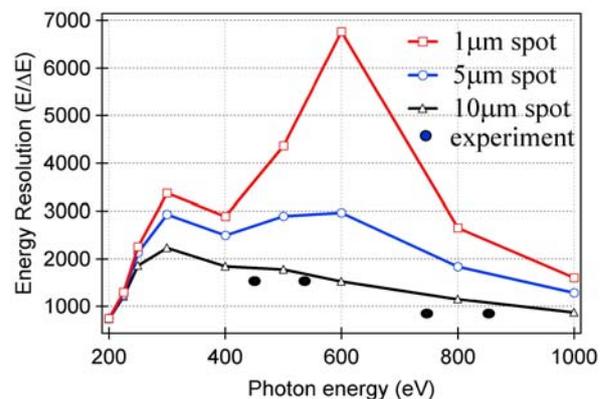


図1 軟X線発光分光器の分解能

(2) 生体物質の軟X線吸収、発光分光測定の成功

従来の溶液試料の測定は、これまで真空槽に溶液セルを持ち込むことによって行われてきたが、温度や送液速度等をコントロールするのが難しい上に、照射ダメージを回避するのが極めて困難であった。そのために試料の劣化が激しく、外国も含めて軒並み実験に失敗している。そこで、本研究では、**世界で初めて、生体物質の溶液を送液しつつ、温度コントロールしながら簡便に測定**できるような装置を作成した(次ページ参照)。

Fe3d 電子状態は吸着分子により図2のような変化が予想されている。この**Fe3d 電子状態を直接観測**することが本研究の目的である。ヘム核にCO分子が吸着した場合(MbCO)と水分子が吸着した場合(metMb)で、10mM程度に精製、濃縮したミオグロビン溶液を用いて Fe2p 励起内殻吸収と軟X線発光スペクトルを測定した。吸収スペクトルにおいては、得られた結果から、観測される吸収スペクトルを理論計算により、解析中である。

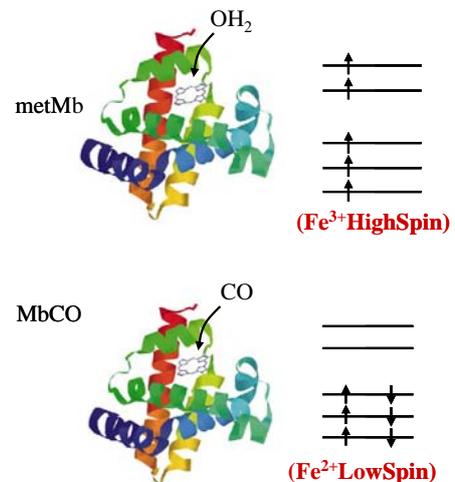


図2 MbCO及びmetMbのFe3d電子状態

一方、Fe2p 内殻発光は元素選択性に優れるため、分子量16500の中に鉄1原子しか含まれないほど微量にもかかわらず、測定可能である。図3に測定した発光スペクトルの比較を示す。1 スペクトルの測定に半日~1日かかっているが、送液によって照射ダメージの影響は完全に排除している。タンパクの軟X線発光を測定し、**d-d遷移を議論できたのは世界で初めて**である。スペクトルにおいても、MbCOとmetMbの違いは低ラマンシフトエネルギー側で大きく、高ラマンシフトエネルギー側では小さい。3d多重項の違いは**Tanabe-Sugano**のダイアグラムで説明することができる。高ラマンシフトエネルギー側で変化が小さいのは、**3d電子相関が弱い事とアミノ酸と3d電子の混成がきわめて大きい事**を示している。混成の大きさはタンパク質中の電子の移動と深い関係がある。現在は、その解析のために理論家に共同研究を依頼し、計算中である。

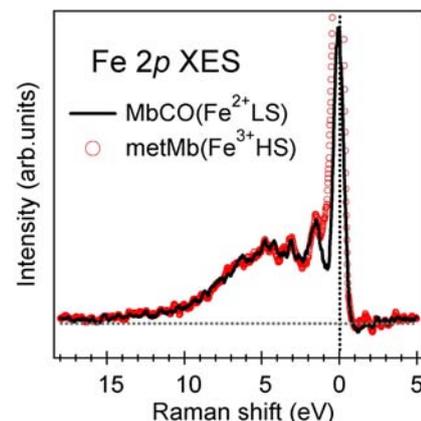


図3 MbCO及びmetMbのFe2p内殻発光

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

本研究で行っている水を含む生物物質の研究は、国際的にきわめて評価されており、早くも、この半年間に海外から国際会議の招待講演の要請が多数来ており、本研究は海外でも大変注目されている。今後、このような溶液系の電子状態の研究が海外でも進むものと思われる。

(1) 送液システム及び試料急速冷凍システムの確立

これまで、溶液系の電子状態を測定することは軟X線領域ではほとんど不可能であった。本研究によって、タンパク溶液試料の軟X線吸収、発光を測定する目的で開発、構築した送液システムは、**純水や水溶液等、液体全般の電子状態を観測する汎用のツール**として用いることができるようになった。今後は軟X線領域において、固体以外の溶液や気体においてもこれまでできなかった電子状態の研究が進むことが期待できる

図1に送液システムの概略を示す。送液ラインは Si_3N_4 薄膜を介して直接真空槽と接続している。 Si_3N_4 薄膜の破損による溶液試料のビームライン上流への拡散を抑えるため、緊急作動ポンプ、ダイヤフラム、冷却トラップ等を備えており、万一膜が破れた場合も1日以内で復旧できるようになっている。また、膜厚、開口面積、Auによる表面コーティング等の最適化を行うことによって、強酸、強アルカリを除くあらゆる試料での測定を可能にしている。

一方で、送液するほどの量を用意するのが困難な（貴重な）光合成タンパク試料などに対しては、急速冷凍によって試料をディスク上に固定し、ディスクを連続駆動することで照射ダメージの回避を図るシステムを構築中である。

(図2)

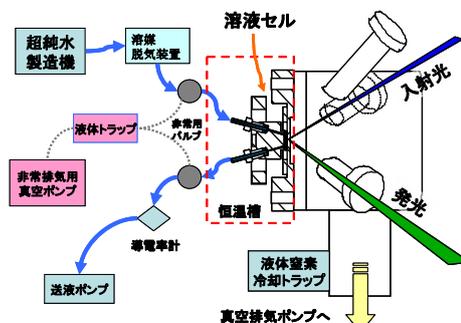


図1. 溶液試料測定システム

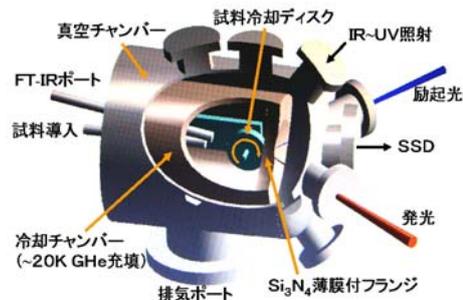


図2. 急速冷凍試料測定システム

(2) 純水の電子構造と化学反応性の発見

近年、水の研究が著しく進んでいる。水そのもののおもしろさや、実生活における重要性は言うまでもない。一方、タンパク質やDNAにおいても、水は、それらの構造を安定化させるだけでなく、その機能性においても重要な役割を担っていることが構造生物学の立場から明らかにされつつある。本研究はそれに対比するものであり、水素結合や電子状態の立場から水の研究に対して新しい知見を得ることができた。

図3に、送液システムのテスト用に測定した純水の $\text{O}1s$ 内殻励起発光スペクトルを示す。我々の高エネルギー分解能のスペクトルは、従来封入セルを用いて得られていた結果[1,2]では分離できていなかった非結合性軌道($1b_1$ 軌道)が2つに分裂することを初めて明らかにした。これは水の局所的な配位環境として明確に2種類あることを示しており、さらに2つのピークの強度比から、従来の正四面体4配位の水素結合という液体の水の基本構造モデルには修正が必要であることが示唆される画期的な事実を発見した。

更に、詳細な水の電子状態の情報を元に、溶質分子やイオンの添加によって水の電子状態そのものがどのように変化するかを調べることができる。この方法では、溶質分子やイオンが水に与える影響を観測することが出来る。これまで研究することが全く不可能であった疎水性水和、疎水性相互作用などの研究に新たな知見を与えることが予測される。

[1] J.-H. Guo et al., Phys. Rev. Lett. **89**, 137402 (2002).

[2] M. Odellius, et al., Phys. Rev. Lett. **94**, 227401 (2005).

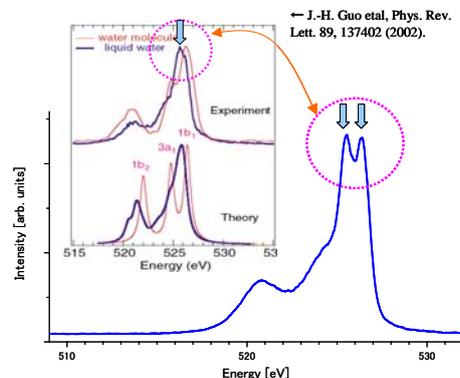


図3. 水の $\text{O}1s$ 発光スペクトル (本研究と過去の結果の比較)

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

誌上発表

- ① High performance slit-less spectrometer for soft X-ray emission spectroscopy
T. Tokushima, Y. Harada, H. Ohashi, Y. Senba, and S. Shin
Rev. Sci. Instrum., in press.
2. Electronic structure of DNA nucleobases and their nucleotide dimers explored by soft X-ray spectroscopy
Y. Harada, T. Takeuchi, H. Kino, H. Fukuyama, A. Fukushima, K. Takakura, K. Hieda, A. Nakao and S. Shin
J. Chem. Phys., in press.
3. Direct observation of site-specific valence electronic structure at the SiO₂/Si interface
Y. Yamashita, S. Yamamoto, K. Mukai, J. Yoshinobu, Y. Harada, T. Tokushima, T. Takeuchi, Y. Takata, S. Shin, K. Akagi, and S. Tsuneyuki
Phys. Rev. B **73** (2006) 045336-045339
4. Effects of interface roughness on the local valence electronic structure at the SiO₂/Si interface: Soft X-Ray absorption and emission study
Y. Yamashita, S. Yamamoto, K. Mukai, J. Yoshinobu, Y. Harada, T. Tokushima, Y. Takata and S. Shin
J. Phys. IV France **132** (2006) 259-262
5. Direct observation of the site-specific valence electronic structure at SiO₂/Si(111) interface
Y. Yamashita, S. Yamamoto, K. Mukai, J. Yoshinobu, Y. Harada, T. Tokushima, T. Takeuchi, Y. Takata, S. Shin, K. Agaki and S. Tsuneyuki
e-J. Surf. Sci. Nanotech. **4** (2006) 280-284
6. Local bonding structure in mechanically activated TiH₂ and TiH₂⁺ graphite mixture
E. Z. Kurmaev, O. Morozov, T. I. Khomenko, Ch. Borchers, S. N. Nemnonov, Y. Harada, T. Tokushima, H. Osawa, T. Takeuchi, S. Shin
J. Alloys Comp. **395** (2005) 240-246.
7. Direct observation of a neutral Mn acceptor in Ga_{1-x}Mn_xAs by resonant x-ray emission spectroscopy
Y. Ishiwata, T. Takeuchi, R. Eguchi, M. Watanabe, Y. Harada, K. Kanai, A. Chanani, M. Taguchi, S. Shin, M. C. Debnath, I. Souma, Y. Oka, T. Hayashi, Y. Hashimoto, S. Katsumoto, and Y. Iye,
Phys. Rev. B **71** (2005) 121202(R)-121205(R).
8. Ion irradiation induced reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ and Fe⁰ in triethoxysilane films
R. G. Wilks, E. Z. Kurmaev, J. C. Pivin, A. Hunt, M. V. Yablonskikh, D. A. Zatselin, A. Moewes, S. Shin, P. Palade, and G. Principi
J. Phys.: Condens. Matter **17**(2005)7023-7028
- ⑨ Intermolecular Interaction by Apical Oxygen in Titanyl Phthalocyanine
Y. Harada, T. Tokushima, Y. Takata, N. Kamakura, T. Takeuchi, K. Kobayashi, Y. Shirota and S. Shin,
Jpn. J. Appl. Phys. **44** (2005)L1147-L1149
10. Graphitization of tetrahedral amorphous carbon films induced by core electron excitations
S. Liang, Y. Harada, S. Shin, Y. Kitajima, Y. Mera, K. Maeda
Jpn. J. Appl. Phys. **44** (2005) L1472-L1474
11. Electronic Structure in Valence Band of Nd-Substituted Bi₄Ti₃O₁₂ Single Crystal Probed by Soft-X-Ray Emission Spectroscopy
T. Higuchi, Y. Noguchi, T. Goto, M. Miyayama, S. Shin, K. Kaneda, T. Hattori, and T. Tsukamoto,
Jpn. J. Appl. Phys. **44** (2005) L1491-L1493

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

12. Iron Nanoparticles in Amorphous SiO₂:X-ray Emission and Absorption Spectra
E. Z. Kurmaev, D. A. Zatsepin, S. O. Cholakh, B. Schmidt, Y. Harada, T. Tokushima, H. Osawa, S. Shin, and T. Takeuchi
Phys. Solid State **47** (2005)754-757.
13. Resonant X-ray emission spectroscopy in scandium halids
M.Matsubara, Y.Harada, S.Shin T.Uozumi, and A.Kotani.
J. Phys. Soc Jpn. **73** (2004) 711-718.
- ⑭ Polarization dependence in resonant soft X-ray emission spectroscopy of 3d transition metal compounds
Y. Harada and S. Shin
J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom. **136** (2004) 143-150.
15. Dynamical symmetry breaking under core excitation in graphite: polarization correlation in soft X-ray recombination emission
Y. Harada, T.Tokushima, Y.Takata, Y.Kitajima, S.Tanaka, Y.Kayanuma, and S.Shin
Phys. Rev. Lett. **93** (2004)17401-17405.
16. Band Structure of Sr_{0.5}Ba_{0.5}Nb₂O₆ thin film probed by soft x-ray emission spectroscopy
N.Ohtake, T. Higuchi, K.Ando, A.Fukushima, S. Shin and T. Tsukamoto
Jpn. J. Appl. Phys. **43** (2004)7327-7628.

和文報告

1. 軟X線吸収発光分光法によるSiO₂/Si界面電子状態のサイト選択的観測
山下良之、山本達、向井孝三、吉信淳、原田慈久、徳島高、高田恭孝、辛埴、赤木和人、常行真司
表面科学 26巻(2005)514-517
2. 軟X線発光の偏光依存性の研究とその応用
原田慈久
放射光 18巻(2005)101-103
3. 軟X線再結合発光で見るグラファイトの原子移動
原田慈久、辛埴
分光研究 53巻(2004)297-298.

国際会議の招待講演

1. Soft X-ray emission study on electronic structures of transition metal compounds,
International workshop on x-ray scattering and electronic structures, 5-7 June 2006, Spring-8,
Hyogo, Japan
S.Shin (Invited talk)
2. High resolution soft X-ray emission study on water,
Stockholm Discussion Meeting; Local Structure and Molecular Scale Properties of Liquid Water,
Stockholm, Sweden, June 14-16, 2006
S.Shin (Invited talk)
3. Resonant soft X-ray emission spectroscopy on water and protein in water,
The 13th International Conference on X-ray Absorption Fine Structure (XAFS13), Stanford,
USA July 9-14, 2006
S.Shin (Invited talk)
4. Soft X-ray Raman scattering study on water, alcohol and biomaterials,
The 20th International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2006),
Yokohama, Japan, August 20-25, 2006
S.Shin (Invited talk)

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

5. Dynamical lattice distortion in graphite observed by soft X-ray recombination emission, Pacificchem2005, Honolulu, USA, December 15-20, 2005
Y. Harada, T. Tokushima, Y. Takata, T. Takeuchi, Y. Kitajima, S. Tanaka, Y. Kayanuma, L. Pan, Y. Nakayama, S. Shin (Invited talk)
6. Soft X-ray emission study on electronic structure and Fermiology of transition metal compounds, Photon-in and Photon-out X-ray Spectroscopy in Material Sciences, Environmental Energy and Chemical Analysis, ALS, USA, October 19-20, 2004
S. Shin (Invited talk)

口頭発表

1. 軟X線発光分光法による水の電子状態の観測、2006年1月9日、放射光学会(名古屋)、徳島 高、原田 慈久、宮嶋 良治、辛 埴
2. 液体、溶液試料のための軟X線分光装置の開発と現状、2006年1月17日、PF研究会、(つくば)、徳島 高
3. 共鳴軟X線発光分光による混合原子価Ti酸化物薄膜における価数変化の直接観測、2006年3月22日、応用物理学会(東京)、堀場弘司、江口律子、竹内智之、徳島 高、原田慈久、大沢仁志、仙波泰徳、大橋治彦、郡司遼佑、大友明、川添良幸、川崎雅司、辛 埴
4. Resonant inelastic soft X-ray scattering study on electronic structures of transition metal compounds; from strongly correlated materials to metal protein, 2006年3月27日、物理学会(松山)、辛 埴 (招待講演)
5. 液体試料のための軟X線発光実験装置の開発と水溶液の電子状態の観測、2006年3月29日、物理学会(松山)、徳島高、原田慈久、宮嶋良治、辛埴
6. 軟X線発光分光による水-アルコール混合系の電子状態の観測、2006年3月29日、物理学会(松山)、原田慈久、徳島高、宮嶋良治、辛埴
7. 研究会「軟X線光学素子の生成と評価の現状と将来展望(IV)」(日本原子力研究所関西研究所木津)、「高効率・高エネルギー分解能軟X線発光分光器の開発」、2005年2月15、徳島 高
8. 高効率・高分解能軟X線発光分光器の開発と水の軟X線発光分光、2005年9月9日、電気学会研究会光・量子デバイス研究会(東京)、徳島 高、原田慈久、宮嶋良治、辛 埴
9. 水-アルコール混合系の電子状態の観測、2005年9月30日、分子構造総合討論会(東京)原田 慈久、徳島 高、宮嶋 良治、辛 埴
10. 軟X線発光分光法による水の電子状態の観測、分子構造総合討論会2005、2005年9月27日(火)~30日、徳島 高、原田 慈久、宮嶋 良治、辛 埴
11. Development of a liquid flow cell for soft x-ray emission spectroscopy, Pacificchem2005, 2005/12, Honolulu, T. Tokushima, Y. Harada, S. Shin
12. Soft X-ray emission spectroscopy of biomaterials, Pacificchem2005, 2005/12, Honolulu, Y. Harada, T. Tokushima, Y. Miyajima, Y. Shiro, T. Takeuchi, A. Fukushima, H. Kino, H. Fukuyama, K. Takakura, K. Hieda, S. Shin
13. Cu-Fe, Cu-Coシアノ錯体のN1s吸収・発光、2004年3月29日、物理学会(箱崎)、原田慈久、秋津貴城、栄長泰明、大沢仁志、竹内智之、辛埴