

平成30年4月1日発行(毎月1回1日発行) 通巻803号 昭和15年4月18日第3種郵便物認可 CODEN:KAKYAU ISSN 0451-1964

C H E M I S T R Y

化学

APRIL
2018
Vol.73

4

解説 • Research article

原子分解能顕微鏡で 化学反応機構を調べる!

解説 • Research article

室温でC-H結合を
水酸化する人工金属酵素

紹介 • Topics

分子構造の“扉”で
ヘパリンを計測する



原子分解能顕微鏡で化学反応機構を調べる！

—— 一体いくつの分子を調べればよいのだろうか

岡田 賢¹・山内 薫²・原野幸治²・中村栄一²

¹海洋研究開発機構海洋生命理工学研究開発センター・²東京大学大学院理学系研究科

化学反応をこの目で見たい。化学者の長年の夢がようやく実現しようとしている。原子分解能をもつ透過電子顕微鏡を用いて、 C_{60} 分子が一つひとつ反応する様子を解析することによって、反応の活性化エネルギーを求めることに成功した。

とつ分子を反応させ、これを逐一観察することにした。その結果、化学反応の個々のイベントが確かに量子力学的な遷移状態理論に従って挙動することを明らかにできた¹⁾。ここでは電子線のエネルギーが、CNTを通して分子の励起に使われていることもわかった。

分子の世界を見る

有機化学の主役は数オングストロームの大きさをもつ分子であり、その構造、動き、反応を知り、望みの機能を発揮させるために日夜研究が行われている。有機分子の構造を知る方法としては核磁気共鳴分光(NMR)や質量分析(MS)などが広く用いられ、ここで得た情報を分子式として紙に描き分子模型にして議論される。しかし、分光分析から分子模型に至る道筋には、本質的に大きな論理的飛躍がある。

このような研究はどうすれば実現できるのだろうか？これに対し、筆者らがだした結論は、CNTの内側や外側につけた分子を、原子分解能の透過電子顕微鏡(TEM)で1分子1分子を観察すればよい、というものである。反応を連続的に観察するためには、最新鋭のCMOSイメージセンサーも必須である。こうすれば、原子間力顕微鏡や走査トンネル顕微鏡と異なり、TEMは基質を基板の上につきちりと固定することなく分子を観察できるので、有機分子の配座変化、移動、そして化学反応を実時間で観察できる。また、これらの分子は観察下で自然と回転してくれるので、これを分析すれば三次元構造についての情報さえも得られる。これは筆者(中村)が2007年にはじめて報告し、「単分子原子分解能実時間」の頭文字をとって「SMART-TEMイメージング法」と名づけた方法論である²⁾。

分光分析の対象は10の十数乗個という分子であり、その結果は統計平均像であるが、分子一つひとつがその統計平均のとおりの挙動をしているかどうかは自明ではない(図1)。量子力学によれば、分子の動きや反応はてんでんばらばらに起こる現象だが、一方でその「てんでんばらばらの度合い」は量子力学で規定される確率論に従うはずである。三次元空間で自由に動き回る一つひとつの分子の構造を個々に調べる方法は残念ながらいまだ知られていないので、この予測を実際に確かめることはまだ誰もできていない。そこで筆者らは、単層カーボンナノチューブ(CNT)の一次元空間内で一つひ

TEMで有機分子を見るために

1932年のドイツでKnollとRuskaらが発明したTEMは、

おかだ・さとし ● 海洋研究開発機構海洋生命理工学研究開発センター研究員、2015年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了、〈研究テーマ〉電子顕微鏡による分子の動的イメージング

はらの・こうじ ● 東京大学大学院理学系研究科特任准教授、2007年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了、〈研究テーマ〉電子顕微鏡を駆使した分子集合体科学の探究

やまのうち・かおる ● 東京大学大学院理学系研究科教授、1985年東京大学大学院理学系研究科博士課程中退、1986年論文博士、〈研究テーマ〉物理化学、強光子場科学

なかむら・えいいち ● 東京大学大学院理学系研究科特任教授・名誉教授、1978年東京工業大学大学院理工学研究科博士課程修了、〈研究テーマ〉有機化学

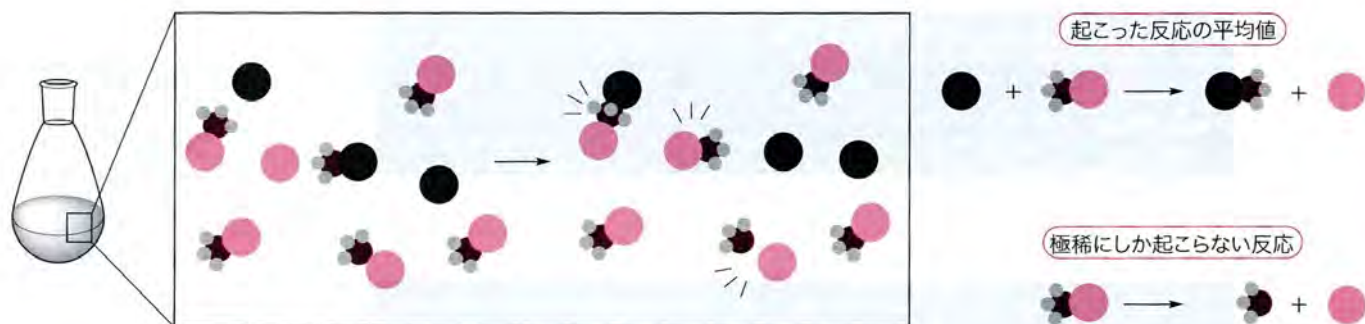


図1 化学反応のイメージ

私たちが化学反応として見ているものは、個々の分子が反応するというイベントが膨大な数積み重なってできたものである。また、メインイベントのみに注目するため、稀にしか起こらない現象は目に留まらない。

対象物に 60～3000 kV (今回の研究では 120 kV) で加速された電子を照射して観察する顕微鏡であり (図 2 a), 電子の波動性を利用して原子像を電子の干渉像として観測する手法である。たとえば 120 kV で加速された電子の de Broglie 波

長は 3 pm 程度なので、150 pm 程度の距離で結合している炭素-炭素結合のあいだを通り抜けると干渉作用を示し、電磁レンズを通して拡大してセンサーに映し出すと原子像を与える。電子の速度は光速の約 60% ときわめて速く、たとえば 1 nm サイズの分子との相互作用の時間はわずか 10^{-18} 秒と、分子振動速度に比べてきわめて速い。したがって一つひとつの電子は分子のスナップショットの情報をもっている。ただし、一つひとつの電子軌跡はセンサー上では点に過ぎないので、何万個の電子がセンサーに到達してはじめて干渉像が見えてくる。このため TEM 撮影の時間解像度は、原理的にはサブピコ秒程度ではないかと筆者らは想像している。しかし残念ながら、電子銃からの送出電子量の制約もあり、現在のところサブミリ秒 (10^{-4} 秒) より速い速度では画像を記録できないので、この予測についてはまだ究極的な証明は得られていない。

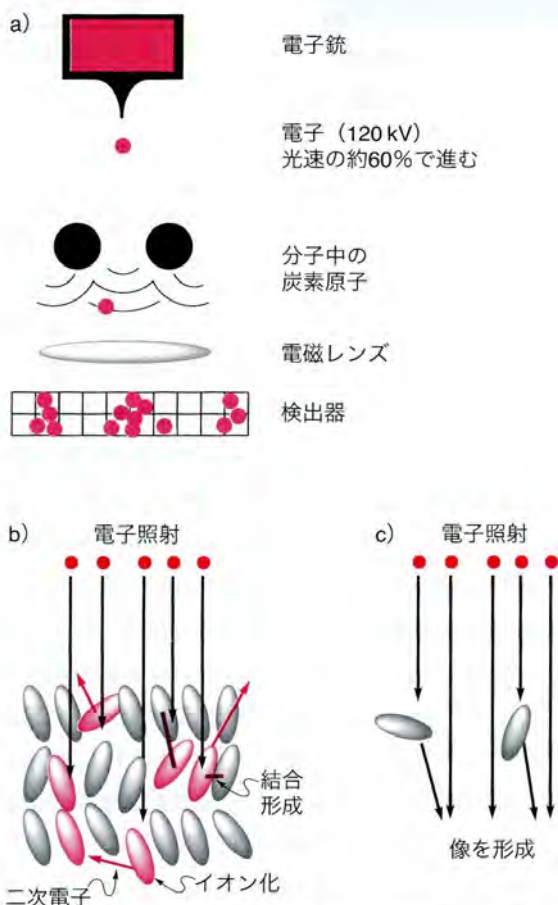


図2 原子分解能 TEM による単一分子の観察

a) TEM による有機分子画像取得の原理 (エタンのような 2 炭素分子を例示した)。b) 有機固体での損傷。固体の分子は電子線により容易に損傷する。c) 単分子での損傷。真空中に孤立した有機分子は損傷しない。

このように TEM は一つひとつの分子の原子分解能スナップショットを撮影するのに十分な実力をもっていたが、それが人びとによく理解されてこなかった。筆者らの研究以前には、TEM による有機物の研究はもっぱら有機分子の結晶やアモルファスの氷に包埋したサンプルを用いて行われてきた。ここに知られざる問題があったのである。

照射された電子線のエネルギーの多くは結晶や氷に吸収され、ここで生じる電子と分子の相互作用によって発生する数十 eV の遅い二次電子はさらに周囲の分子をイオン化し、ネズミ算式に分子を破壊する (図 2 b)。このため、照射する電子線の量を可能な限り絞ることが、電子線ダメージを減らすための解決策だと考えられてきた。

たとえば、タンパク質などの生体高分子をアモルファス状の氷に分散させて観察するクライオ電子顕微鏡法^{*1}では、比較的低倍率の写真を、 1 nm^2 あたり数千電子だけ照射して撮

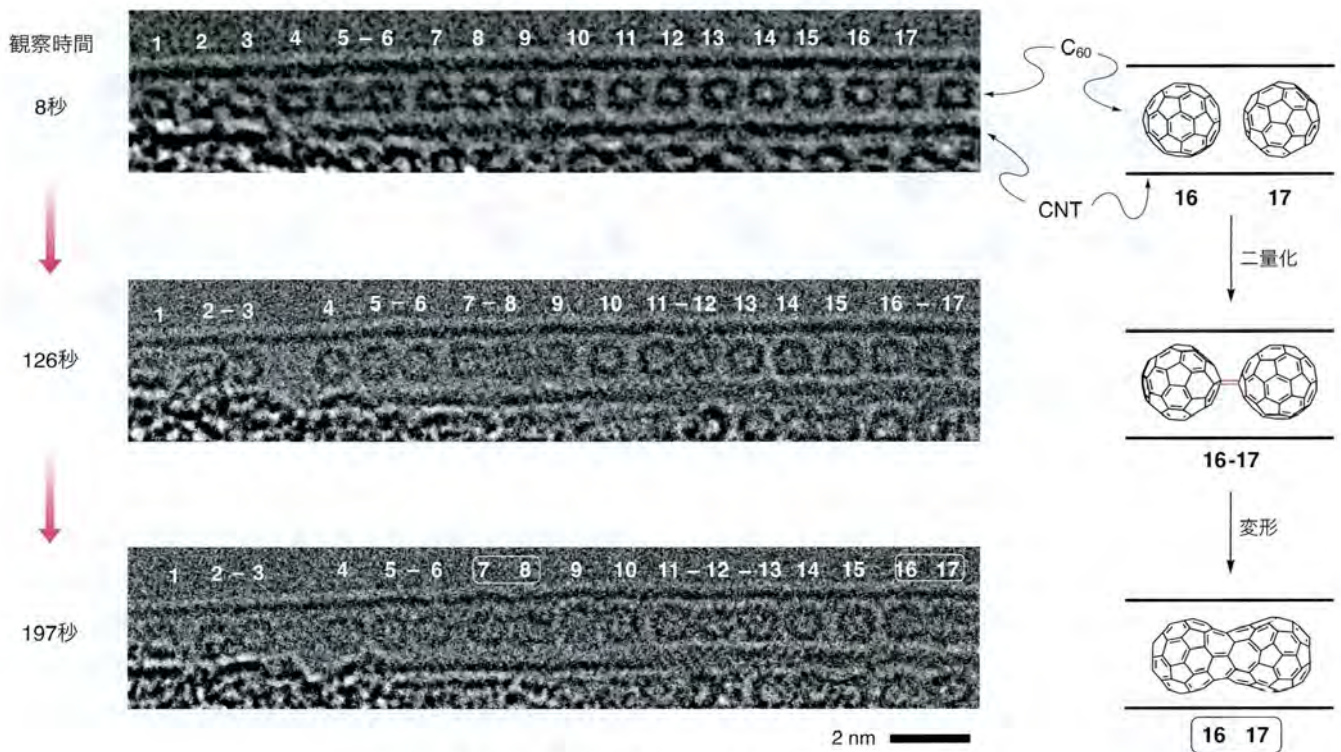


図3 CNT内でC₆₀が二量化する過程を捉えたTEM動画
図は文献1より許可を得て転載。

影する³⁾。こうして得られるうっすらとした分子の像を、数千から数十万個重ね合わせ、コンピュータによって再構成することで平均的分子像を得る。この手法は、2017年のノーベル化学賞に輝いた業績である。

TEMで有機分子1個の動きが見えた

この既存の手法に対して筆者らは、分子を一つひとつ真空中で観察すれば、分子を壊すことなく観察できるのではないかと考えた(図2c)^{2,4)}。具体的には、直径1~2 nm程度の単層カーボンナノチューブのなかに分子を詰めたり、チューブの外側に載せたりすることによって、分子1個の並進、回転、配座変化など、分子の動きを可視化することに成功したのである¹⁾。この研究を論文で発表したのは2007年のことだが、それ以来、「有機分子がTEMで見える」という事実が人びとに広く受け入れられるまで10年の時間を必要とした⁶⁾。

*1 液体窒素温度に冷却した試料ホルダを用いてTEM観察する手法。とくに、タンパク質粒子などの大きな分子をアモルファス状の水のなかに閉じ込めて観察し、得られた数万個の粒子像を種類ごとに仕分けてコンピュータ処理することにより、タンパク質の三次元構造を再構成するという手法が有名。試料作成法(J. Dubochet, R. Henderson)と解析法(J. Frank)の開発者に2017年のノーベル化学賞が授与された。

TEMで見える反応は量子力学に従っていた!

このSMART-TEM法を用いて、分子が反応する様子を直接目で見て研究することはできないだろうか⁷⁾。電子線照射量を一定にした条件下($3.1 \times 10^5 \text{ e}^- \text{ nm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)、443 Kで観察した実際のTEM像が図3である。TEMで観察すると、時間経過とともに隣接したC₆₀のあいだで[2+2]環化反応により結合が形成され、ダンベル状の二量体(C₁₂₀)になる。さらに時間が経つと二量体内で異性化が起り、ピーナッツ型のC₁₂₀、あるいはさらに[2+2]環化と異性化を繰り返して、より大きな重合体へと変化する。予想どおり反応は間欠的に起り、C₆₀分子に対して1分間、およそ100万個の電子を照射してようやく1組のC₆₀分子が[2+2]環化反応で二量化する程度である。ちなみにこのサンプルを443 Kに加熱してもまったく反応は進行しないので、電子励起状態を経由して反応していることは明らかである。

図3に示したC₆₀の二量化反応自体は20年も前から知られていた現象である⁸⁾。筆者らが着目したのは、この現象が「化学反応は分子レベルで見れば量子力学的な原理に従うはずである」という理論的予測を具現しているのではないかとということである。量子力学に基づき分子1個のレベルで記

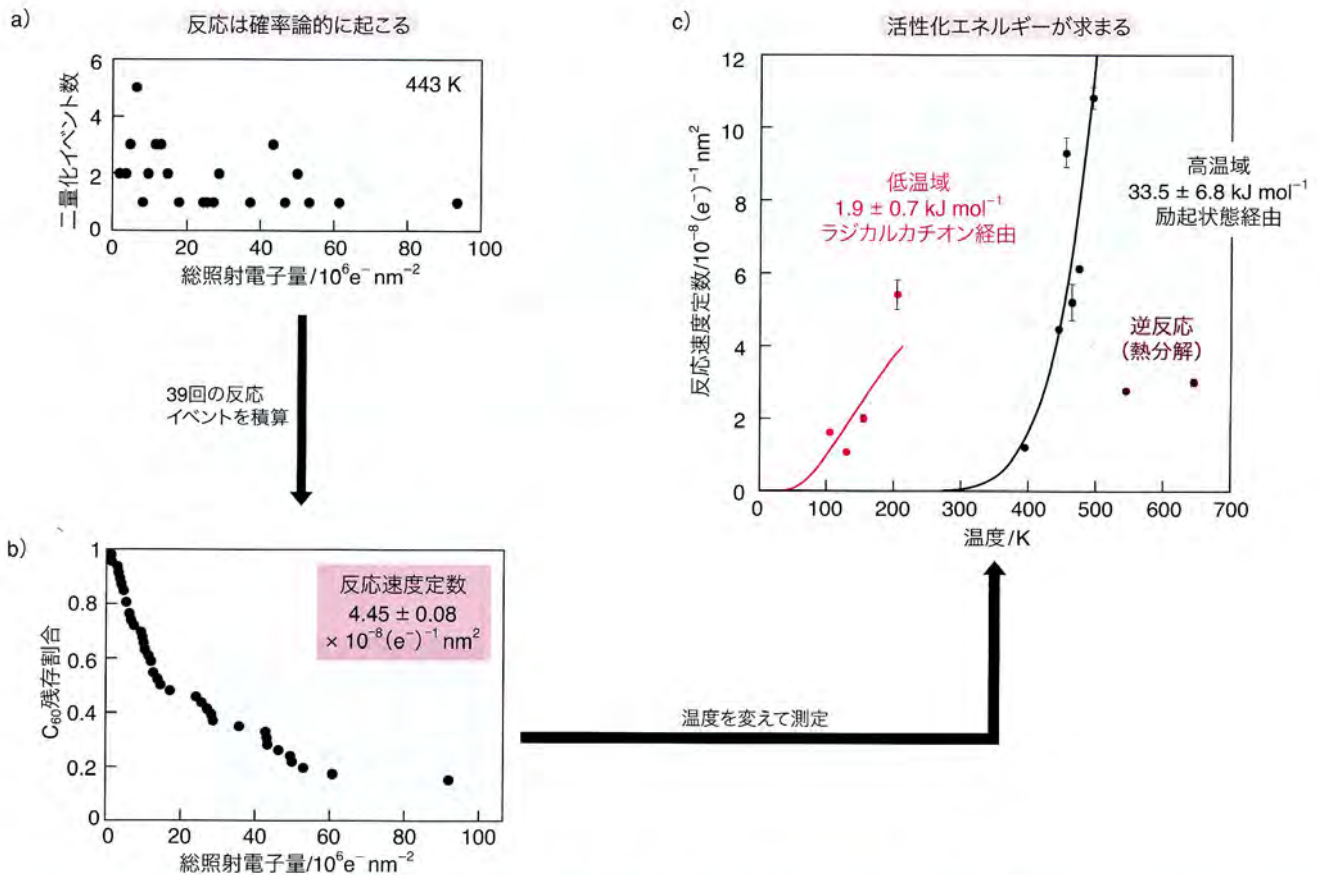


図4 TEM で見た C_{60} 二量化の画像からの反応速度の算出

a) 443 K において個々の反応は確率論的に起こる。b) その頻度を積算すると、その温度での速度定数が求まる。c) さまざまな温度での速度定数から活性化エネルギーが求まる。図は文献1より許可を得て転載。

述した RRKM 理論^{*2}は、反応が「てんでんばらばらに起きる度合い」、すなわち「反応の確率は分子のエネルギー単位へのエネルギーの統計的な分配」で決まると教えてきた。しかしながら、実験的な証明はなかったのである。そこで、この仮説を検証してみることにした。

あらためて図3を振り返ってみよう。一連の TEM 像では反応が一つずつ見えて、電子線を何分照射したときに何回反応が起こったかがわかる。総照射電子量(反応時間に1:1対応する)を横軸に、5秒刻みの反応頻度の積算値をグラフ化すると図4(a)のようになる。次に、反応せずに残っている C_{60} 分子の総量を総照射電子量に対してプロットした図4(b)を見てみると、指数関数的に総量が減少していることが見てとれる。

同様にして温度を変えてデータをとり、これを Arrhenius

プロットしたところ二量化反応の活性化エネルギーが求まった(図4c)。興味深いことに、反応温度を103 K から643 K へと大きく振ってみると、三つの異なる反応が起きることがわかる。すなわち500 K 以上での熱的なレトロ[2+2]反応、393 ~ 493 K のあいだでの活性化エネルギー 33.5 kJ mol^{-1} の[2+2]反応、103 ~ 203 K のあいだでの活性化エネルギー 1.9 kJ mol^{-1} の[2+2]反応が見つかった。バルク固体での反応の文献との比較から、393 ~ 493 K での反応は一重項励起状態の反応、低温の反応は C_{60} のラジカルカチオン経由の反応であると結論した。つまり、たかだか数百個の分子の反応を観察するだけで、Avogadro 数個を用いた研究と同じ結果が得られたことになる。

TEM 観察ではたくさんの分子が別べつの反応を起こしている様子を同時進行で分析できる。これが原子分解能顕微鏡による反応機構研究の一大特徴である。

*2 量子力学に従う分子1個が反応する際の反応速度を記述した理論の一つ。RRKMの名称はこの理論を開発したRice, Ramsperger, Kassel, Marcusの4人の頭文字に由来する。

今回の研究により、わずか数百分子に関する速度論解析に基づいて化学反応の活性化エネルギーを求め、反応機構を決定することができた。今回は電子励起反応の例を示したが、熱反応の追跡にも適用可能であると推測される。

また、原子分解能 TEM を用いた観測が「たった 1 分子の観察で分子構造を決定できる」という他の追従を許さない高感度分析であるという特徴を生かせば、天然の有機資源のような混合物でも、分離精製することなく個々の分子を見分け、構造を決め、それぞれの反応を追跡することができるようになることが期待される。原子分解能 TEM による分子および化学反応のその場観察手法の開拓は、化学研究の新しい時代の幕開けを告げるものといえよう。

謝辞：本研究において多数の原子分解能電顕動画撮影と解析を行った小鷲智理さんに感謝いたします。



参考文献

- 1) S. Okada, S. Kowashi, L. Schweighauser, K. Yamanouchi, K. Harano, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 18281 (2017).
- 2) E. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 236 (2013).
- 3) 岡田 賢, 出口 茂, 化学, **71** (10), 70 (2016).
- 4) K. Harano, S. Takenaga, S. Okada, Y. Niimi, N. Yoshikai, H. Isobe, K. Suenaga, H. Kataura, M. Koshino, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 466 (2014).
- 5) M. Koshino, T. Tanaka, N. Solin, K. Suenaga, H. Isobe, E. Nakamura, *Science*, **316**, 853 (2007).
- 6) E. Nakamura, *Acc. Chem. Res.*, **50**, 1281 (2017).
- 7) M. Koshino, Y. Niimi, E. Nakamura, H. Kataura, T. Okazaki, K. Suenaga, S. Iijima, *Nature Chem.*, **2**, 117 (2010).
- 8) S. Bandow, M. Takizawa, K. Hirahara, M. Yudasaka, S. Iijima, *Chem. Phys. Lett.*, **337**, 48 (2001).

▲

HPLCカラム インタクト

世界にはばたく Made in Japan のHPLCカラム専門メーカー

<p style="text-align: center; font-weight: bold;">ライフサイエンス分離</p> <p>LC-MS用 インタクトアミノ酸分析 <small>イントロラーダ</small></p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Intrada Amino Acid</p> <p style="text-align: right; font-size: 10px;">世界初</p> <p>蛋白質などの高分子逆相分離</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Intrada WP-RP</p>	<p style="text-align: center; font-weight: bold;">新製品 シリカ系サイズ排除(SEC)カラム</p> <p style="font-size: 10px;">水系・非水系揮発性移動相 / GFC GPC両モード対応 タンパク質のSEC-MS, mAb/酵素精製に</p> <p style="font-size: 24px; font-weight: bold;">Intrada SEC</p>	<p style="text-align: center; font-weight: bold;">伝統的固定相の進化</p> <p>水100%系から非水系まで 分離バランスに優れた汎用性</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Unison UK-C18</p> <p style="font-size: 10px;">高極性から低極性まで 耐酸性が高く塩基性化合物にも好適</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Unison UK-C8</p> <p style="font-size: 10px;">高極性から低極性まで 配位性化合物に最適</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Unison UK-Phenyl</p> <p>非水系から水系までの順相+カチオン交換</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Unison UK-Silica</p> <p>非水系から水系までの順相+アニオン交換 水系移動相における卓越した耐久性</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Unison UK-Amino</p>
<p style="text-align: center; font-weight: bold;">選択性の異なる多機能ODSシリーズ</p> <p>優れた分子認識 ペプチドなどの多成分分離 <small>カデンツァ</small></p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Cadenza CD-C18</p> <p>CD-C18と対比 新発想, シラノール量制御</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Cadenza CL-C18</p> <p>血清(血しょう)直接注入 液剤中の高分子と薬物の分離</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Cadenza HS-C18</p> <p>ワイドポアによる高速分離 抗生物質や塩基性化合物</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Cadenza CW-C18</p>	<p style="text-align: center; font-weight: bold;">逆相+アニオン交換+カチオン交換 分離カラム <small>スケルツォ</small></p> <p style="font-size: 24px; font-weight: bold;">Scherzo C18 Family</p> <p>従来のODSカラムでは 困難なイオン性の高極 性化合物が簡単に保 持・分離できます。</p> <p>アニオンもカチオンも 同時に分析できる世界 初のマルチモードODS カラム。LC-MS対応。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>ODS + アニオン固定相</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>ODS + カチオン固定相</p>  </div> </div>	<p style="text-align: center; font-weight: bold;">高分解能ノンポーラス2μmODS <small>世界初</small></p> <p>分子量の上限を突破 ペプチド, 蛋白質, 生体・合成高分子 mAbアイソフォーム分離</p> <p style="text-align: center; font-size: 10px;">プレスト</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Presto FF-C18</p>
<p style="text-align: center; font-weight: bold;">シリカ/ポリマー Dual-Matrix ODS</p> <p>アルカリで使用可能なODSカラム</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">DACAPO DX-C18</p> <p style="text-align: right; font-size: 10px;">世界初</p>	<p style="text-align: center; font-weight: bold;">逆相+アニオン交換+カチオン交換 = マルチモードODS <small>世界初</small></p> <p>逆相分離に加えて イオン性(アニオン, カチオン) 物質を同時分析 LC-MSに好適</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Scherzo SS-C18</p> <p style="font-size: 10px;"><small>スケルツォ</small></p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Scherzo SM-C18</p> <p style="font-size: 18px; font-weight: bold;">Scherzo SW-C18</p>	

▲ Imtakt

www.imtakt.com | www.imtaktUSA.com | PHONE: 075-315-3006 FAX: 075-315-3009

〒600-8813 京都市下京区中堂寺南町 京都リサーチパーク インタクト株式会社 E-MAIL: info@imtakt.com