

# 分子アンサンブル研究

## Molecular Ensemble Research

代表研究者 加藤 礼三

KATO, Reizo

(加藤分子物性研究室)

(Condensed Molecular Materials Laboratory)

分子アンサンブル (Molecular Ensemble) とは、各部分が調和のとれた連携を示し、それらが統合されることによって高度に制御された機能を持つ、分子システムを意味している。「分子」は我々の世界を構築する最も重要な物質単位の一つであり、生命現象、化学反応、電気・磁気・光学的現象等を、理解しさらに制御するためには、「分子」およびその集合体の本質的理解が不可欠である。本研究は、小分子ラジカル反応系や有機金属触媒系に始まり、ラジカル分子が集合して構築された分子性伝導体や分子磁性体のような分子性結晶、表面・界面の分子系、高分子系、さらにタンパク質やDNAのような生体分子複合系にまでおよぶ、広範囲にわたる分子系の機能を、分子および結晶の構造、さらに電子構造のレベルにまで掘り下げて理解することを目指し、その理解を基に機能の制御や新しい物質の創製へと展開することを目的としている。

### 1. 分子アンサンブル制御・開発研究

局所電子状態、分子間相互作用を設計・制御することによって新しい分子化合物や分子機能を開発することを目指す。大きな目標として、以下の2つのテーマを2本柱とする。

- ・分子デバイス実現に向けての基礎の確立
- ・触媒機能の制御と高度化 (有機金属触媒, タンパク質機能制御)

#### (1) 分子デバイスのための基礎研究

##### ① 二量化が極めて強い金属-dmit 錯体における二量体内電荷分離現象の発見

研究担当者: 山本 (貴) <sup>\*1</sup>, 田村, 加藤 (加藤分子物性研究室)

二量化の強い分子性伝導体は、二量体を1格子点と見なし、1格子点で電荷の二重占有を禁じるクーロン力 ( $U_{dimer}$ ) と、各格子点間における電荷の移動積分 ( $t_{inter}$ ) という、2種のパラメータにて概ねの物性を記述できると信じられてきた。ところが、二量体内電荷分離が観測されないのは、極めて不自然であり、何らかの理由があるはずである。我々は、70 Kで非磁性転移を示す、三斜晶系  $EtMe_3P[Pd(dmit)_2]_2$  の分子内振動を測定した結果、転移温度以下で二量体内電荷分離が起こり、二量体2個が繰り返し単位を持つ (四量化) ことが分かった。そもそも、 $\beta'$ -型  $Pd(dmit)_2$  分子性伝導体は、二量体が積層構造を持つという構造的特性を有する。従って、格子歪みを伴った四量化と、分子間クーロン力 ( $V$ ) による二量体内電荷分離が共同的に作用できたため、電荷分離が実現したのである。二量体間電荷分離にならなかったのは、(平均)二量体間距離が小さいため、軌道準位の再配列が起こりえないからである (但し、軌道準位の逆転は起こっている)。

観測の結果、四量体の種類は少なくとも2種類あることも分かった。この現象は、イオン性的分子間の二量体間移動積分が大きくなるという四量化と、中性的分子間の二量体間移動積分が大きくなる四量化という、2種類の四量化が共存しており、それぞれに対して、二量体内電荷分離が組み合わされている、ということの意味する。事実、室温から四量化モードが観測されており、これは両者の構造が競合していることを支持している。低温では、四量化モードの揺らぎがほぼ消失したので、どちらか一方の構造が優勢的になっている。この現象は、分子軌道準位の逆転が起こるため、中性的分子間の移動積分の増大が促進されるという、二量体間電荷分離による研究結果と符合する。

一方、二量化の強い分子性伝導体の代表格である、 $\kappa$ -型 BEDT-TTF 塩は、上記の構造的な要請を満たさない。従って、電荷は揺らぐだけに留まり、二量体内電荷分離は起こらないのである。

ところで、 $\beta'$ -型  $Pd(dmit)_2$  塩の結晶構造は、積層構造を持たない  $\kappa$ -型 BEDT-TTF 塩と、二量化が弱く積層構造を持つ  $\beta'$ -型 BEDT-TTF 塩の中間に位置する。これまでに多く合成されてきた、 $\beta'$ -型  $Pd(dmit)_2$  の物性は、 $\kappa$ -型 BEDT-TTF 塩の研究になぞらえた解釈が概ね成り立つ。一方、後者の伝導性は、電荷揺らぎの程度が重要な要因と考えられている。従って、 $\beta'$ -型  $Pd(dmit)_2$  の中でも二量体内で電荷が揺らぐ物質は、有機伝導体の統一的な理解に至るモデル化合物として期待できる。

(dmit = 1,3-dithiol-2-thione-4,5-dithiolate, BEDT-TTF = bis(ethylenedithio)tetrathiafulvalene)

##### ② 局在スピントと伝導電子が共存した超分子アニオンラジカル塩 (Me-3,5-DIP) $[Ni(dmit)_2]_2$

研究担当者：高坂<sup>\*2</sup>，加藤，田村，山本（浩），田嶋（陽）<sup>\*3</sup>，深谷<sup>\*4</sup>（加藤分子物性研究室）

(Me-3,5-DIP)[Ni(dmit)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>は(Me-3,5-DIP)とNi(dmit)<sub>2</sub>との間に超分子I⋯SおよびH⋯S相互作用を形成したアニオンラジカル塩である。結晶学的に独立な2つのNi(dmit)<sub>2</sub>アニオン層(Layer I, II)を持ち、Layer Iが局在スピンをLayer IIが伝導電子を持つことがこの塩の最大の特徴である。両者の協奏的な現象を見いだすため、圧力下での電気抵抗測定を行った。静水圧下では、加圧に伴い面内方向で高温領域における金属的挙動が強調されたが、面間方向では絶縁体的な振る舞いが保たれたままであった。低温(約10 K以下)では電気抵抗は各軸方向とも $-\log T$  ( $T$ : 絶対温度)に比例する振る舞いを示す。面間方向へ一軸性ひずみをかけた時も、電気抵抗の $-\log T$ 依存性が見られた。これは、近藤一重項のような状態がこの系で実現している可能性を示している。(Me-3,5-DIP = *N*-methyl-3,5-diiodopyridinium, dmit = 1,3-dithiol-2-thione-4,5-dithiolate)

### ③ 微小電極による分子性導体の基板上単結晶成長とその電気特性評価

研究担当者：山本（浩），川相<sup>\*5</sup>，池田<sup>\*5</sup>，加藤（加藤分子物性研究室）；塚越（河野低温物理研究室）

分子性導体の微小結晶を基板上に成長させ、その電気特性を基板上で直接測定することによって、電界効果・界面現象・結晶サイズ効果等の評価を行った。

(DMe-DCNQI-*d7*)<sub>2</sub>Cuのマイクロ/ナノ結晶については、以前SiO<sub>2</sub>/Si<sup>++</sup>基板上で太さ100 nm程度の単結晶について電気抵抗の温度依存性を測定し、バルク結晶で見られる80 Kの金属⇄絶縁体転移が消失することを見いだしていた。その原因についてはこれまでいくつかの可能性を考え検討を行ってきたが、今回バルク結晶をカーボンペーストとエポキシ樹脂でシリコン基板に固定すると、低温まで結晶が割れることなく測定が可能となり、その場合にも80 Kの金属⇄絶縁体転移が消失することを確認した。これはシリコン基板の熱膨張係数が数ppm/Kと非常に小さく、その数十倍の熱膨張係数を持つ分子性導体は基板に固定されることによって低温で実効的に負の圧力を感じているためであると考えられる。

(DMe-DCNQI-*d7*)<sub>2</sub>Cuに関するこうした解釈に基づくと、 $\alpha$ -(BEDT-TTF)<sub>2</sub>I<sub>3</sub>で見られた金属⇄絶縁体転位の転移温度が、基板上のマイクロ結晶では約15 K上昇するというこれまでの結果も、同様の負圧効果が原因であると推測できる。また、転位の温度幅がバルク結晶に比べて広がる現象も結晶内での歪みが原因であると考えたと説明がつく。以上の解釈を前提として、低温の電荷秩序相における電界効果測定を行った。その結果、サンプルはn型の電界効果トランジスタ(FET)動作を示し、I-V曲線はモット・ガーニー則に従うことが明らかとなった。これは一般的な絶縁体にキャリア注入を行う場合と同様の挙動である。昨年度の測定ではON/OFF比が1.1程度と非常に小さい値であったが、今年度は結晶作製条件の最適化を行い、結晶に歪みの生じにくい条件で測定を行うとON/OFF比を40まで向上させることができた。また、基板をシリコンからプラスチックに代えると、転移温度がバルク結晶のそれに近い値となることが明らかになった。一方、 $\alpha$ -(BEDT-TTF)<sub>2</sub>I<sub>3</sub>は圧力下において、最近注目を集めているグラフィエンと同様のゼロギャップ伝導体になることも知られている。ゼロギャップ伝導体は低キャリア密度、高移動度の系であり、電界効果測定に最適の状態にある。従って圧力下での電界効果測定も検討した。現在、シリコン基板を使った実験では圧が均一にかからないが、プラスチック基板を使うと比較的均一に圧力がかかることをつきとめ、さらなる検討を行っているところである。

他方、超伝導体として知られる $\kappa$ -(BEDT-TTF)<sub>2</sub>Cu[N(CN)<sub>2</sub>]Brについても抵抗の温度依存性やゲート電圧依存性について検討を行った。この系は弱い負圧で超伝導体からモット絶縁体になることが知られており、実際シリコン基板上サンプルの抵抗値温度依存性は絶縁体的な挙動を示した。これにゲート電圧をかけると $\alpha$ -(BEDT-TTF)<sub>2</sub>I<sub>3</sub>の電荷秩序相と同様、n型のFET動作をし、ON/OFF比は最大で10<sup>3</sup>に達した。また、サンプルのAFM測定を行い、結晶の厚みを正確に求めるとともに、表面の分子ステップ分布についても観察した。(DMe-DCNQI = 2,5-Dimethyl-*N,N'*-Dicyanobenzoquinonediimine, BEDT-TTF = bis(ethylenedithio)tetrathiafulvalene)

### ④ 分子薄膜層における電荷注入と物性制御

研究担当者：川合，加藤（浩）（川合表面化学研究室）

電子デバイスにおける新規な機能を拡充するために、分子性薄膜へ電荷を注入し特性を制御する研究は、未来の分子デバイスに様々な可能性を与えるものと期待されている。本研究では、昨年に引き続き、有機電界効果トランジスタ(有機FET)における電荷注入と電子状態変化に関する研究を進めた。

有機FETは、電界によって有機分子薄膜へキャリアを注入し、薄膜の導電性を制御する電子素子である。基本的な動作原理は、無機半導体と同様に、フェルミ準位近傍の電子状態バンドベンディングによって説明されているが、分子性薄膜の場合、電子状態は局在性が強いため有機FET内の電子状態変化も異なる可能性がある。この違いを解明することは、分子の機能性を生かした未来の分子デバイスを創造する上でとても重要である。本研究では、実際に有機FETを試作して、電荷注入の際に起こる有機分子薄膜内部の電子状態変化を直接観測する手法を確立することに努めてきた。いくつかある手法の中で、最も力を入れているのが蛍光X線を検出するX線吸収分光法(XAS)である。これまでにアセン系薄膜に対して、薄膜内部の電子状態を測れることを確認したほか、全面を金電極で覆った薄膜試料に十分な電界を掛けた状態でも、薄膜内部の電子状態を感度良く測れることを確認することができた。

## (2) 希土類ポリヒドリドクラスターの研究

### ① イットリウムポリヒドリド錯体の金属ヒドリド結合へのエチレン挿入に対する計算化学研究

研究担当者：侯，羅<sup>\*6</sup>（侯有機金属化学研究室）

金属ヒドリド結合へのアルケンの挿入は、水素化反応や重合反応において重要な鍵反応である。このメカニズムに関しては計算化学的手法を用いた単核錯体の研究は数多く行われているが、架橋したヒドリドを有する多核錯体の研究はこれまでほとんど行われていなかった。本年度はイットリウムポリヒドリド錯体[(Me<sub>3</sub>SiC<sub>5</sub>Me<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Y<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]におけるイットリウム-ヒドリド結合へのエチレン挿入反応に対する理論研究を行った。このポリヒドリド錯体には架橋様式が異なる<sub>4</sub>-Hが一つ、<sub>3</sub>-Hが一つ、<sub>2</sub>-Hが6つ存在する。<sub>4</sub>-Hは、4核構造の中心に位置しているためエチレン挿入反応には関与しない。ONIOM(B3LYP:HF)という計算化学的手法を用いて<sub>3</sub>-Hと<sub>2</sub>-Hのエチレン挿入反応について検討した結果、<sub>2</sub>-Hの挿入の方が速度論的に有利になり、<sub>2</sub>で架橋したエチル基を生成することが明らかになった。

## ② 計算化学による希土類ヒドリドクラスターの存在および構造予測

研究担当者：侯，羅<sup>\*6</sup>，島<sup>\*4</sup>（侯有機金属化学研究室）

単核のヒドリド化合物は実験および理論計算の面から詳細に研究されている。一方、ヒドリドクラスターは単核の化合物とは異なる物性の発現が期待されるが全く合成例がない。本年度は、Ln<sub>3</sub>H<sub>9</sub>やLn<sub>4</sub>H<sub>12</sub>等のヒドリドクラスターについて理論計算を行い、これらの存在および構造について予測を試みた。まずLn<sub>3</sub>H<sub>9</sub>について3種類の構造異性体を計算した結果、環状の5配位構造が最も安定であることが分かった。予期せぬことに、希土類元素の5d軌道とヒドリドの1s軌道の寄与により、芳香族性を有することが示唆された。またLn<sub>4</sub>H<sub>12</sub>については、平面構造や鎖状構造に比べ四面体構造が最も安定であることが明らかとなった。単核の化合物LnH<sub>3</sub>と比較してLn<sub>3</sub>H<sub>9</sub>やLn<sub>4</sub>H<sub>12</sub>は、103-204 Kcal/molほど安定であり、これらのヒドリドクラスターが存在しうることを予測した。

一方、イットリウムポリヒドリド錯体とモリブデンヒドリド錯体を反応させることにより、d-f混合金属ヒドリド錯体の合成に成功した。これは、水素と可逆的に反応することが判明し、現在実験および計算の両面からその詳細な反応機構について検討している。

## (3) タンパク質機能制御の研究

### ① ホスファターゼ阻害剤 RK682 エナミド誘導体の効率的合成法の確立と VHR との相互作用解析

研究担当者：平井，小山<sup>\*5</sup>，袖岡（袖岡有機合成化学研究室）

プロテインホスファターゼ VHR は、リン酸化セリン，スレオニン，チロシンをすべて脱リン酸化できる両特異性ホスファターゼの一種である。RK682 は、長田抗生物質研究室で単離された強酸性の 3-アシルテトロン酸骨格を有する天然物であり、顕著な VHR 阻害活性を示すことが知られている。我々は RK682 を基盤として、中性分子で VHR に対する阻害活性を有する RK682 エナミド誘導体 (RE 誘導体) を開発した。今年度は RE 誘導体の効率的合成法を開発し、これまでに比べ大量合成可能なルートを確認した。VHR と RE 誘導体との複合体を計算化学的に発生させた結果、RE 誘導体は VHR の活性中心に結合していることが示唆されている。現在、この複合体の X 線結晶構造解析を長田抗生物質研究室と共同で検討している。

### ② タンパク質と低分子化合物（バイオプローブ）の相互作用解析

研究担当者：奥村<sup>\*6</sup>，長田（長田抗生物質研究室）

グリオキサラーゼ I(GLO1)はメチルグリオキサールとグルタチオンから S-D-ラクトイルグルタチオンを生成させる酵素である。これまでに長田抗生物質研究室において、真菌由来化合物ゲルフェリンのメチルエステル体であるメチルゲルフェリン(M-GFN)が GLO1 を標的とし、破骨細胞の分化を阻害することを明らかにした。本年度は M-GFN の詳細な阻害機構を明らかにするため、M-GFN と GLO1 の複合体の X 線結晶構造解析を試みた。マウス GLO1 と M-GFN の共結晶化を行い、X 線回折データ測定を行った結果、1.7 Å 分解能で構造解析することができた。得られた構造モデルにおいて、M-GFN は GLO1 の基質ポケットに結合しており、M-GFN の有する二つの水酸基が GLO1 の活性部位に存在する亜鉛イオンに配位していた。これまでにいくつかの GSH 誘導体型阻害剤と GLO1 の複合体構造が報告されている。これらの阻害剤は主として亜鉛との配位結合に加え、阻害剤の GSH 結合部位が GLO1 のアミノ酸残基と水素結合を形成していた。それら阻害剤のうちの一つ、S-(N-hydroxy-N-p-iodophenylcarbamoyl)glutathione (HIPC-GSH)と GLO1 の複合体構造においては、阻害剤の GSH 部とリジン残基，メチオニン残基，アスパラギン残基，2つのアルギニン残基と水素結合を形成していた。これに対し M-GFN ではこの領域において3つのフェニルアラニン残基，2つのメチオニン残基に囲まれ、疎水性相互作用を主とした相互作用をしており、既存の GSH 誘導体型 GLO1 阻害剤とは異なる結合様式をとっていることが明らかとなった。

## (4) 蛍光タンパク質の開発

### ① 2 波長同時照射で蛍光シグナルを得られる Dronpa 変異体

研究担当者：安藤<sup>\*7</sup>，水野，宮脇（細胞機能探索技術開発チーム）

Dronpa は青色光を吸収して緑色の蛍光を発するフォトクロミックな蛍光タンパク質である。490 nm の強い光を照射すると暗状態に移行し、400 nm の照射で元の明状態に戻る。Dronpa にランダムに変異を入れることによって、明状態-暗状態間のスイッチングをより高効率に起こす2つの Dronpa の変異体 (Dronpa2 と Dronpa3) を得た。これらの変異体は、

アルゴンレーザーの 488 nm で励起すると、速やかに暗状態に移行するため、蛍光をほとんど発することができない。一方、紫色レーザー(405 nm)で励起しても蛍光シグナルは出ない。ところが、488 nm と 405 nm を同時に照射すると、暗状態—明状態間の往來の結果、明状態の励起分子の数を増やすことができることが分かった。実際に、Dronpa3 を HeLa 細胞のミトコンドリアと細胞膜にターゲットし、2 波長同時照射依存的な蛍光像を撮影することに成功した。

## ② 光異性化能を持つ蛍光タンパク質における構造的なフレキシビリティの光による制御

研究担当者：水野，宮脇（細胞機能探索技術開発チーム）

蛍光タンパク質 Dronpa はフォトクロミズムを示すが、その分子機構は解明されていない。暗状態の結晶構造解析が困難を伴い、明状態の結晶構造だけでは分子機構を議論できないためである。我々は NMR を用いることによって溶液中・室温という条件下での解析を行い、暗状態での構造のフレキシビリティを検討した。光によって発色団とβ-バレルの相互作用の変化が誘導され、これが明状態と暗状態を切り替えていることを見いだした。明状態では、発色団の先端部分が水素結合によってβ-バレルにつなぎ止められ、またβ-バレルから内側へ突き出したイミダゾール環によって発色団の平面性が安定化されていた。これらの相互作用が青い光の照射によって崩され、β-バレルの一部および発色団がフレキシブルになり、無輻射遷移過程が引き起こされていた。

## ③ サンゴ由来蛍光タンパク質による凝集体様構造物(dots)の正体

研究担当者：片山，宮脇（細胞機能探索技術開発チーム）

DsRed, mRFP1 等のサンゴ由来蛍光タンパク質は、哺乳類細胞に発現させた際に凝集体様構造物(dots)を形成することが欠点であると見なされていた。この dots はアグリソームのように、細胞質における凝集体であると考えられていたが、本研究における検討の結果、リソソーム内腔での蓄積物であること、すなわち、サンゴ由来蛍光タンパク質は酸性条件下でリソソームプロテアーゼに抵抗性であるためリソソーム内腔に蓄積することが示された。また、オートファジー不能細胞でも dots は形成されることから、細胞質成分をリソソームへ運ぶ未知の輸送機構の存在が示唆されており、この輸送機構については現在検討を進めている。

## 2. 分子アンサンブル測定・解析研究

測定・解析グループと協力し、広範囲にわたる分子系が示す種々の複雑な現象・機能を局所的電子状態の協奏的連携として理解し統一的原理の構築を目指す。特に、「生体物質の機能の電子論的究明」を大目標の一つとして設定する。

### (1) 放射光 X 線を用いた機能性分子システムの局所電子状態解析

#### ① 環境応答型細胞情報伝達系における分子間・分子内相互作用の研究

研究担当者：城，中村，菊地（城生体金属科学研究室）

細菌や菌類，植物の環境（光，酸素，栄養等）感知・細胞内情報伝達は、環境センサーとして働くヒスチジンキナーゼ（HK）と、レスポンスレギュレーター（RR）の二つのタンパク質間の ATP 依存性のリン酸基転移反応を介して行われ、「二成分情報伝達系」と呼ばれる。現在、数百種もの二成分情報伝達系遺伝子が明らかになっているものの、HK の環境因子感知の分子機構は依然不明である。環境変化に応答した細胞内情報伝達における、「ドメイン間の分子内情報伝達機構」，「HK の ATP 依存性自己リン酸化機構」および「HK-RR 間におけるリン酸転移機構」を非共有結合相互作用の観点から解明することを目的としている。

(i) 高度好熱菌由来の HK 触媒ドメインの高分解能構造を各種条件下で得る事に成功した。十種類の構造比較から、ATP 類縁体の結合で、触媒ドメインの基本骨格は変化しないが、その結合部位を覆うループ部分が大きく構造を変化させる事を見いだした。これらの結果と、昨年度構築した HK と RR の複合体構造（3.7 Å 分解能）を基に、HK 自己リン酸化機構との関連で議論した。

(ii) ジフテリア菌はヒト上気道粘膜に感染する病原菌であり、その増殖には血液ヘモグロビンのヘムを主な鉄源として必要とする。ヘムの濃度に依存して、ヘムから鉄を取り出すためのヘム分解系が誘導される事が分かっている。本年度より、このヘム濃度を感知するセンサー系の研究を開始した。ジフテリア菌の二成分情報伝達系 ChrS/ChrA がヘム依存的にリン酸転移反応を引き起こす事を初めて示し、この系がヘム分解系の発現を制御するヘムセンサーであると結論した。この自己リン酸化はヘム依存的であり、ポルフィリンや亜鉛，コバルトポルフィリン錯体では効果がないことも判明した。また、ヘムによる活性化にはセンサードメインの His21 が必須の機能を果たしていることが分かった。

#### ② タンパク質□ 補欠分子構造における分子内相互作用の研究

研究担当者：菊地（城生体金属科学研究室）

我々は、30 種以上の GFP 様蛍光タンパク質群の精密構造解析に成功している。その構造を基盤にして、各種蛍光タンパク質の蛍光特性（蛍光の有無，色，強度等）を理解する目的で、京大工学部の量子化学グループとの共同研究によりクロモフォアの電子状態計算を開始した。

#### ③ 放射光による分子性結晶ならびにタンパク質の分子内・分子間の電子分布マッピング

高田構造科学研究室では、放射光回折データをマキシマムエントロピー法（MEM）により解析し分子内・分子間の電子分布をマッピングするだけでなく、その電子分布に基づいて得られる静電ポテンシャルも含めて実験的に可視化する

ことにより、構造と分子機能との相関解明を目指している。平成 19 年度は、研究対象とする物質により研究テーマを以下の 3 項目に細分化し、個々の研究テーマについて集中的に取り組んだ。それぞれの研究目標を達成するためには、理研内の密接な共同研究が必要不可欠であり、研究テーマ i と iii では加藤分子物性研究室、テーマ ii では俣有機金属化学研究室と連携して研究を進めた。

(i) 超低温高圧下 X 線回折による超伝導分子性結晶の構造物性研究と X 線磁気回折法の開発  
研究担当者：大隅（高田構造科学研究室）

分子性結晶  $\text{EtMe}_3\text{P}[\text{Pd}(\text{dmit})_2]_2$  の超伝導状態の構造研究を目的とした、多重極限条件下 X 線回折システムの構築を行っている。本年度は、減圧冷却が可能なヘリウム 4 連続フロー式クライオスタットを導入し、金属ベリリウム製クランプ型セルを 1.5 K まで冷却して試料からの回折スポットが得られることを確認した。今後、クランプ型セルの仕込み圧力の条件探索を行い、超伝導状態にある  $\text{EtMe}_3\text{P}[\text{Pd}(\text{dmit})_2]_2$  の構造研究を目指す。これらの研究に加えて、中性子回折実験が困難な分子性結晶の磁気構造研究を目的として、放射光 X 線を用いた磁気回折実験の手法開発も行った。

(ii) 異常 X 線小角散乱法によるタンパク質に収容された金属原子の可視化  
研究担当者：伊藤<sup>\*8</sup>、水野<sup>\*4</sup>（高田構造科学研究室）

X 線小角散乱法は溶液中のタンパク質分子の大きさ、形状、集合状態に関する構造情報を得ることができる強力な手法であるが、異常分散効果を利用した異常 X 線小角散乱法 (ASAXS) により金属含有タンパク質と金属元素の構造情報を分離することができる。さらに、ASAXS によって得られた構造情報を逆モンテカルロ法 (RMC) や MEM を駆使して実空間情報へと可視化する技術を合わせて開発し、構造情報と辛グループによる溶液中分子の電子状態に関する情報を組み合わせることにより従来とは質的に異なるタンパク質分子の機能構造相関研究を目指している。フェリチンは分子量 48 万、内径 8 nm、外径 12 nm の球殻状タンパク質であり、生体中で Fe を蓄積する役割を担っているが、その蓄積過程はまだ解明されていない。また、フェリチンは Fe のみならず様々な金属を取り込むことが可能であり、そのサイズをナノレベルで制御できる可能性がありナノテクノロジー分野においても注目されている。本年は、異常分散効果を含んだタンパク質分子の ASAXS シミュレータを開発し、金属含有タンパク質中の金属元素の構造情報を抽出できることをシミュレーションにて確認した。また、大型放射光施設 SPring-8 に設置されている理研専用ビームライン BL45XU にて ASAXS 実験を行うための測定系の整備を行い、Fe, Ni, Co や Au, Pt 等の金属の異常分散効果を測定できることを確認した。現在、表面修飾された Au コロイド粒子の ASAXS 測定を行い解析を進めている。

さらに、MEM を単結晶 X 線結晶構造解析に適用し、金属含有タンパク質の活性中心近傍の電子密度分布を精密に可視化することにより、反応過程を分子構造と電子密度分布の変化として観測する新しい機能相関研究へと発展させることを目指している。本年は、金属含有タンパク質の単結晶 X 線構造解析データに MEM を適用した際の定量性について詳細に検討した。高分解能回折データが得られている Ni-Fe クラスタを活性中心に有する Ni-Fe ヒドロゲナーゼでは、MEM により活性中心周りの電子密度分布の分解能が改善された。構造モデルの精度およびデータの完全性等の問題により活性中心金属の電子数を得るには至らなかった。現在、比較的低分子量の金属含有タンパク質であるミオグロビン等を用いた解析により定量性の向上を進めている。また、俣有機金属化学研究室と連携して、多核希土類ポリヒドリド錯体に対しても MEM を適用し、精密化された電子密度分布から、分子内化学反応のメカニズムを明らかにしようとしている。

(iii) 電子分布および静電ポテンシャルマッピングによる分子性導体の電荷移動の直接観察  
研究担当者：吉田<sup>\*4</sup>、加藤（高田構造科学研究室）

本研究では、粉末 X 線回折実験から MEM を用いて電子密度解析を行い、分子性導体  $\square\text{-(BEDT-TTF)}_2\text{I}_3$  の 135 K における金属  $\square$  絶縁体転移の本質についての解明を目指す。平成 19 年度には、SPring-8 の BL02B2 にて  $\square\text{-(BEDT-TTF)}_2\text{I}_3$  の粉末 X 線回折実験を行い、電子密度レベルの構造まで解析可能な信頼性の高い温度変化のデータを 30 K, 110 K, 160 K の温度について取得することに成功した。得られた回折データに対して MEM/リートベルト解析を行い、相転移前後における  $\square\text{-(BEDT-TTF)}_2\text{I}_3$  の電子密度構造を得た。高温相 (160 K) と低温相 (110, 30 K) を比較した結果、ET 分子を構成する炭素原子の二重結合に明らかな変化が見られた。二重結合間の結合距離は分子の持つ電荷の大きさを反映していると考えられるため、ET 分子間の電荷移動を示唆している。また、セル内の 4 つの分子について、低温相では電荷の大きさが二つのグループに分けられることが分かり、電荷秩序状態の構造が明らかとなった。現在、電子密度から静電ポテンシャルを計算し低温相における電荷秩序状態の精密解析を進めており、この解析を通じて電荷移動の形態が明らかにされつつある。

#### ④ 軟 X 線発光分光によるヘムタンパク質の電子状態の研究

研究担当者：辛、原田<sup>\*9</sup>、徳島（励起秩序研究チーム）

昨年度までに、我々の作製した溶液試料用の高分解能軟 X 線発光分光器を用いて、送液によるヘムタンパク質ミオグロビンの電子状態を観測することに成功したが、軟 X 線発光分光器の分解能が設計の半分程度に留まっており、スペクトルの微細構造を観測できていなかった。今年度はその原因が表面粗さであることを解明し、分解能があがる回折格子を作製した。今後は、スペクトルの微細構造を議論し、より詳細な理論計算と比較する予定である。これまでミオグロビンの軟 X 線発光で観測されている d-d 遷移は Tanabe-Sugano ダイアグラムで説明されることが判明された。また、最低 d-d 励起は強い直線偏光依存性を示すことを見いだした。この実験結果は、Oh 対称性による定性的な解釈ではうまく行かず、

歪んだヘムによる D4h 対称性で説明が可能になった。その結果、より詳細なクラスター計算によるスペクトルの再現が可能になった。

## (2) 超高感度 NMR を用いた生体物質の機能解析

### ① 高分子量タンパク質、タンパク質複合体の NMR 解析法の研究

研究担当者：伊藤<sup>\*10</sup>、美川（城生体金属科学研究室）；柴田（柴田上席研究員研究室）

従来の NMR の手法では解析が困難な 30 kDa を超える高分子量のタンパク質、およびタンパク質複合体について、構造・機能解析を効率よく行うための新しい測定法・解析法の研究を行っている。平成 19 年度は、4 次元 NMR スペクトルを迅速に測定するために、非線形サンプリング法による測定と最大エントロピー法によるデータ処理を組み合わせた方法の研究を行った。4 次元 NMR 法は、曖昧さの少ない解析が可能である等の長所があるにも関わらず、測定時間が長時間におよぶこと、さらに新しい関節観測軸を導入することによる感度低下、間接観測軸のデータポイントの不足によるスペクトルの分解能の問題等から、通常のタンパク質の解析にはこれまで多用されてこなかった。今回開発した方法を用いることで、従来法に比べて非常に短時間で同様の分解能の 4D スペクトルを得ることや、従来法よりもより高分解能の 4D スペクトルを得ることが可能になった。また、細胞内のタンパク質の動態を観測することを目的として、In-Cell NMR の開発研究も継続して進め、高度好熱菌 TTHA1718 タンパク質について主鎖および側鎖 NMR シグナルの帰属を行った。さらに NOE 由来の高次構造情報の取得を行うことで、世界で最初の細胞内タンパク質の立体構造解析に成功した。

### ② NMR 分光法と X 線小角散乱を用いたタンパク質間、タンパク質-基質間の相互作用解析

研究担当者：美川、伊藤<sup>\*10</sup>（城生体金属科学研究室）

DNA 傷害等の結果生じた ssDNA 領域は ssDNA 結合タンパク質 (SSB) によって保護され、実際に組換え修復を行う RecA は結合できない。RecF, RecO, RecR 等のアクセサリ、タンパク質は様々な相互作用を介して SSB の ssDNA からの解離を促し、RecA の組換え修復の進行を助けることが知られている。我々は、NMR と電子顕微鏡観察による相互作用解析の結果、RecO がまず ssDNA 上の SSB と入れ代わり、次にその ssDNA-RecO-SSB の RecO に RecR が相互作用することにより SSB が部分的に解離することを見いだした。また、RecF, RecO, RecR タンパク質が同時に存在すると RecFR 複合体が優位に形成されるが、X 線小角散乱による分子形状解析の結果、その複合体は RecF 2 分子、RecR 4 分子からなるリング構造であることが明らかになった。リング径やリング内の陽電荷分布からこのリングの内部に DNA が結合することが容易に想像できたため、RecFR 複合体は dsDNA 上を移動して ssDNA-RecO-SSB 複合体と相互作用することにより dsDNA-ssDNA 領域を認識しているというモデルを提唱した。

## (3) 機能性分子系の局所磁気状態の解明

### ① STM を利用した単一スピン検出

研究担当者：小野<sup>\*6</sup>、坪井<sup>\*6</sup>、花栗、□ 木（□ 木磁性研究室）

スピントロニクスへの期待とともに、局所的なスピン検出への期待が高まっている。局所的な磁気的プローブとしては、走査型ホールプローブ顕微鏡や、走査型磁気力顕微鏡が知られているが、その空間分解能は数 m から数 nm にとどまっており、単一原子、単一分子に遡ってスピン検出を行うことは、未だに困難である。単一原子を識別するためにはサブ nm の空間分解能が必要であり、そのためには走査型トンネル顕微鏡の利用が現実的である。我々は、磁場中でラーモア歳差運動するスピンとトンネル電流の相互作用を利用する電子スピン回転 (ESR) STM の開発に取り組んでいる。本年度は ESR-STM の性能テストを行ったが、実験室の音響ノイズが測定に大きな影響与えることが分かり、より静かな環境への装置の移設を行った。また、効率よく測定を行うため、複数の試料と探針を同時に装置内に搬入するための導入室をシステムに付加した。また、ESR-STM とは相補的なスピン検出手法として、既設の極低温強磁場 STM を利用し、電子スピンのゼーマン分裂を非弾性トンネル電流を介して検出する非弾性トンネル分光法を検討している。現在、両手法を用いたスピン検出に適した分子の検討を行っている。

### ② 収量検出磁気共鳴・過渡光吸収検出による 2・3 スピン連携

研究担当者：坂口（川合表面化学研究室）

有機半導体では、電子の担い手はラジカルイオンである。ラジカルイオンは奇電子によるスピンを持ち、電極界面では正・負のラジカルイオン対が形成される。このスピン対は一重項または三重項状態で、電荷再結合過程は多重度により変化する。このスピンを磁気共鳴の手法を用いて操作することで、ラジカルイオン対の挙動を制御し、電子移動過程の詳細を明らかにすることができる。

本年度は高分子系有機 EL 素材である、ポリフェニレンビニレン系の発光挙動に対する磁場および共鳴電磁波の効果調べた。EL 素子を定電流パルスで駆動した場合の磁場依存性は定電圧パルス駆動とほぼ同じで、今後は供給電子数が等しくなる定電流駆動に移行したい。駆動電圧が切れた後の減衰過程に見られる発光強度の磁場効果とマイクロ波効果は通電時より大きく、電場がラジカルイオン間の交換相互作用を増加させていることが分かった。この結果から、有機 EL 材料の大きな磁場効果の原因は、溶液系で見られる「ラジカルイオン対の寿命が長く、磁場・マイクロ波の効果を受け易い」ためだけでなく、「電荷再結合が長距離から進むため、交換相互作用が小さい」ためであると結論できる。また、画像計測に

よる研究を開始した。全発光強度で見た場合、高輝度（＝高電圧駆動）ほど磁場効果は小さいが、一定電圧で明るい場所と暗い場所には大きな磁場効果の差は見られなかった。

#### (4) 分光法による機能性分子系の研究

##### 界面選択的偶数次非線形分光の応用

研究担当者：山口、田原（田原分子分光研究室）

昨年度までに、界面選択的なレーザー分光法として二次非線形電子和周波発生 (ESFG) 分光法と四次非線形ラマン ( $\chi^{(4)}$  Raman) 分光法を開発した。今年度は、(1) ESFG による気液界面のタンパク質の研究と、(2) フェムト秒時間分解 ESFG による気液界面の分子のダイナミクスの研究を行った。(1)では、気液界面に吸着したタンパク質シトクロム C の ESFG スペクトルを測定することによって、タンパク質の表面変性について新しい知見を得た。シトクロム C の Soret バンドのピーク波長は、構造を鋭敏に反映することが知られている。水溶液中 (pH=7) で、親水性残基を分子の外側に、疎水性残基を分子の内側に配するように折り畳まれた native な構造の場合、Soret バンドのピーク波長は 410 nm である。一方、酸性水溶液中 (pH=2) で、折り畳まれた構造がほどけた変性状態の場合、ピーク波長は 394 nm にシフトする。空気/水界面のシトクロム C の ESFG スペクトルは非常にバンド幅が広く、native 状態のスペクトルと変性状態のスペクトルを重ね合わせたような形状となった。このことは、気液界面には、折り畳まれた native な構造と変性してほどけた構造が混在していることを示唆している。これまでは、気液界面のタンパク質は、疎水性残基を空気側に、親水性残基を水側に配するほどけた構造をとって変性する、と単純に考えられていた。ESFG によって、気液界面のタンパク質を“そのままの状態”観察することが初めて可能となり、タンパク質の表面変性というよく知られた現象の従来の説明に変更を迫る新しい知見を得ることができた。(2)では、フェムト秒時間分解 ESFG 分光法を開発して、界面分子のフェムト秒時間分解電子スペクトルを世界で初めて測定した。空気/水界面のローダミン 800 (R800) の光励起後のダイナミクスは、バルクの水溶液中とは大きく異なることが分かった。励起状態の R800 の二量体の解離速度は、気液界面ではバルクの 10 倍速く、また、バルクでは見られない高速緩和過程が気液界面に存在することが明らかになった。このことは、界面という場の特殊性を端的に示していて、界面特異的な化学反応の探索は非常に有望であることを示唆している。

#### (5) 多重極限 SR 実験装置の開発研究

研究担当者：松崎、渡邊（岩崎先端中間子研究室）

理研 RAL ミュオン施設（英国：Rutherford-Appleton 研究所 (RAL) 内に設置）においては、分子性物質への SR 測定手法の応用のために、多重極限 SR 実験装置を開発中である。この装置は、高圧下測定・微量試料測定・超低温測定・光照射測定等の極限条件下での分子性物質の SR 研究を可能にする。平成 19 年度においては、この多重極限 SR 装置の基幹となる新分光器の開発・製作を進めた。この分光器は、多重極限条件を実現するための十分な空間を確保するとともに、従来のものに比べて 3 倍以上の 600 本のミュオン検出器を備える。この分光器を理研 RAL ミュオン施設に設置することにより、微小試料においても高効率・短時間で測定を可能にする。分光器製作にあわせて、検出器系の開発も進めている。これまでにない数の検出器を用いるため検出器自体を小型化するとともに、検出効率を維持するために光波長変換器を利用している。検出器単体の性能試験も実施し、目的性能が達成していることを確認した。

分光器製作と同時に、多重極限条件の一環である高圧下条件の開発を進め、世界でも初の試みとなる He ガスを用いたガス加圧型高圧 SR 装置を設計・製作した。このシステムは、試料の設置状況を変えずに連続的に圧力を変化させることが可能であり、SR 測定を極めて効率的に進めることを可能にするという利点を持つ。RAL の高圧グループと共同し、理研 RAL ミュオン施設において得られるパルス状ミュオンビームに特化した高圧セルを製作し、0.64 GPa という設計最高性能の達成を確認した。既に低温での高圧印加試験を終了し、平成 20 年度からの利用を予定している。

\*1 訪問研究員, \*2 ジュニア・リサーチ・アソシエイト, \*3 協力技術員, \*4 協力研究員, \*5 研修生, \*6 基礎科学特別研究員, \*7 テクニカルスタッフ, \*8 業務協力員, \*9 客員研究員, \*10 客員主管研究員

This interdisciplinary research project is aiming to understand exquisite behaviors of the biological systems and molecular-based materials (conductors, magnets, ...etc.) in terms of the non-covalent interactions and their changes at atomic and molecular levels. Our final goal is to design and create a highly organized and functionalized molecular system, each component of which is joined to each other by a variety of weak non-covalent interactions. We call such a system "Molecular Ensemble".

## 1. Molecular Ensemble Development Research

### (1) Basic studies on molecular devices

#### ① The intra-dimer charge separation of dimerized Pd(dmit)<sub>2</sub> salt

It had been believed that the physical properties of the dimerized molecular conductors can be mapped with the on-site Coulomb energy at a dimer,  $U_{\text{dimer}}$ , and the inter-dimer transfer integral,  $t_{\text{inter}}$ . Based on the above model, the time-averaged molecular charges within a dimer can be regarded as uniform. However, it is reasonable to consider that the absence of the intra-dimer charge separation for the dimerized materials indicates that the charge ordered transition for the dimerized system requires an additional factor. We have examined the intra-dimer charge separation using the vibrational spectroscopy of triclinic-EtMe<sub>3</sub>P[Pd(dmit)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> which shows non-magnetic insulating behavior below 70 K. As we have expected, the intra-dimer charge separation is observed below the transition temperature. The observation of the intra-dimer charge separation is ascribed to the structural properties of the β'-type Pd(dmit)<sub>2</sub> salts along with the inter-molecular Coulomb interaction,  $V$ . The Pd(dmit)<sub>2</sub> dimers form a columnar structure and columnar structures form a two dimensional layer, which is significantly different from the absence of the columnar structure in the κ-type BEDT-TTF salts. Owing to the columnar structure, the tetramerization supports the localization of the site charge due to  $V$ . The intra-dimer charge separation also requires the tight inter-molecular distance because the loose distance induces the perturbation of the energy levels in the frontier orbitals resulting in the inter-dimer charge separation.

The fluctuation (disorder) in the lattice distortion is observed (remains) above (below) the transition temperature. When two charges are accommodated into a tetramer, two kinds of symmetric tetramers are allowed. According to the studies on the inter-dimer charge separation for Et<sub>2</sub>Me<sub>2</sub>Sb[Pd(dmit)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> and Cs[Pd(dmit)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>, the transfer integral between charge poor molecules is larger than that between charge rich molecules. This mechanism supports the reduction (enhancement) of one of tetramers below the transition temperature.

From the viewpoint of the structural property, the β'-type Pd(dmit)<sub>2</sub> salts are situated between the κ-type BEDT-TTF salts and the β-type BEDT-TTF salts. As for the previously synthesized β-type Pd(dmit)<sub>2</sub> salts, the physical properties are almost comparable to those of the κ-type BEDT-TTF salts. On the other hand, the conducting properties of the β'-type BEDT-TTF salts, which are non-dimerized or weakly dimerized materials, are mapped with degree of fluctuation in the molecular charges. Therefore, the newly synthesized β'-type Pd(dmit)<sub>2</sub> salts, which exhibits fluctuation or localization due to the charge separation, will belong to a key system which leads to a general understanding for the conducting and magnetic properties of these molecular conductors.

(dmit = 1,3-dithiol-2-thione- 4,5-dithiolate, BEDT-TTF = bis(ethylenedithio)tetrathiafulvalene)

#### ② Supramolecular anion radical salt (Me-3,5-DIP)[Ni(dmit)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> where localized spins and conduction electrons coexist

(Me-3,5-DIP)[Ni(dmit)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> is an anion radical salt having supramolecular interactions between the cation and Ni(dmit)<sub>2</sub> anion. This salt consists of two crystallographically independent Ni(dmit)<sub>2</sub> layers (Layers I and II), where Layer I has localized spins and Layer II has conduction electrons, respectively. We investigated the electrical resistivity under pressure to find the phenomena which come from the interplay of conducting and magnetic electrons. Under hydrostatic pressure, the metallic behavior is enhanced along the in-plane directions. On the other hand, the resistivity still shows insulating behavior along the interlayer direction. In a low temperature region, the resistivity shows  $-\log T$  dependence along each direction. The  $-\log T$  dependence is also observed in the resistivity under uniaxial strain along the interlayer axis. These suggest the possibility that the Kondo-singlet-like state is formed in this system.

(Me-3,5-DIP = *N*-methyl-3,5-diiodopyridinium, dmit = 1,3-dithiol-2-thione- 4,5-dithiolate)

#### ③ Nano-/micro-crystal of molecular conductors on silicon substrate

Electric properties of nano/micro- crystals of molecular conductors directly grown on SiO<sub>2</sub>/Si<sup>++</sup> substrates were examined. In our previous experiment, (DMe-DCNQI-*d7*)<sub>2</sub>Cu nanocrystal was found to show no metal-insulator (M-I) transition upon cooling, despite its bulk crystal exhibited sharp M-I transition at 80 K. Our new experiment revealed that the bulk crystal also showed no M-I transition down to 4 K when it was fixed on a SiO<sub>2</sub>/Si<sup>++</sup> substrate with carbon paste and epoxy resin. This is because the small thermal expansion coefficient of the silicon substrate induces pseudo negative pressure upon the soft organic crystal whose thermal expansion coefficient is several dozen times larger.

α-(BEDT-TTF)<sub>2</sub>I<sub>3</sub> and κ-(BEDT-TTF)<sub>2</sub>Cu[N(CN)<sub>2</sub>]Br single crystals were also grown on SiO<sub>2</sub>/Si<sup>++</sup> substrates. Their field effect transistor properties were measured in their low-temperature insulating phases, the former of which is a charge ordered state and the latter of which is a Mott insulating state. κ-(BEDT-TTF)<sub>2</sub>Cu[N(CN)<sub>2</sub>]Br is normally a superconductor in its ground state, but when it is fixed on the hard silicon substrate, it falls into the insulating ground state due to the pseudo negative pressure from the substrate.

The device properties such as ON/OFF ratio and the field effect mobilities have been quite improved by optimizing the crystal growth conditions and choosing good crystals as well as device configuration.

(DMe-DCNQI = 2,5-Dimethyl-*N,N'*-Dicyanobenzoquinonediimine, BEDT-TTF = bis(ethylenedithio)tetrathiafulvalene)

#### ④ Property control over thin molecular layers by charge injection

In order to extend new functionality of electronic devices, elucidation of property control over thin molecular layers by charge injection is important for future molecular devices. In this study, the charge injection and consequent electronic state change in organic field effect transistor (OFET) have been investigated.

OFET is an electronic device that controls of electric conductivity by injection of carriers into the organic molecular thin-film under the applied electric field. Based on the knowledge of inorganic semiconductor transistors, the conductive mechanism have been generally understood with a scheme of band bending of electronic states. However, the energy diagram may not be the same between inorganic and organic materials, because of more localized orbital of the molecules. It is, therefore, important to elucidate the difference of electronic states for using the peculiar functionality of organic molecular materials for the future advanced devices. In this study, we have exerted ourselves to establish an experimental method, i.e., Fluorescence-yield X-ray absorption spectroscopy (XAS), that can directly observe the electronic state change at deep part of organic thin films in OFET. As a result, we succeed to observe the electronic states of inner organic thin films, even though the organic film is fully covered by a gold electrode with the electric field applied.

### (2) Computational study of rare earth polyhydride clusters

#### ① Computational study of ethylene insertion into the metal-hydrogen bond of the yttrium polyhydrido complex

The insertion of ethylene into a Y-H bond of the tetranuclear yttrium polyhydride complex ( $\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{SiH}_3$ )<sub>4</sub>Y<sub>4</sub>H<sub>8</sub>, a model of ( $\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{SiMe}_3$ )<sub>4</sub>Y<sub>4</sub>H<sub>8</sub>, which possesses one <sub>4</sub>-H, one <sub>3</sub>-H, and six <sub>2</sub>-H atoms, was computationally investigated by the method of two-layer ONIOM (B3LYP:HF). It was found that the enthalpy barrier for the <sub>3</sub>-H migratory insertion (15.3 kcal/mol) is higher than that for <sub>2</sub>-H migratory insertion (10.9 kcal/mol). Both <sub>2</sub>-H and <sub>3</sub>-H migratory insertion reactions lead to a structurally and hence energetically identical insertion product, in which the resulting ethyl group adopts a <sub>2</sub>-Hbridging structure. These results suggest that the <sub>2</sub>-H migratory insertion reaction pathway is kinetically preferable.

On the other hand, the reaction of yttrium polyhydride complex ( $\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{SiH}_3$ )<sub>4</sub>Y<sub>4</sub>H<sub>8</sub> with Mo hydride complex gave the corresponding d-f mixed polyhydride complex, which shows reversible uptake/release of hydrogen gas. The detail reaction mechanism is investigated from both experimental and theoretical approaches.

#### ② Prediction of lanthanide(III) hydride clusters Ln<sub>n</sub>H<sub>3n</sub> (Ln = La, Gd, and Lu; n = 3 and 4)

The binary lanthanide hydride clusters Ln<sub>3</sub>H<sub>9</sub> and Ln<sub>4</sub>H<sub>12</sub> (Ln = La, Gd, and Lu) were predicted theoretically to exist, their formation being thermodynamically favorable. They make a link between the widely studied small molecules and bulk solids of binary lanthanide hydrides. The cyclic pentacoordinated Ln<sub>3</sub>H<sub>9</sub> was unexpectedly found to have significant aromaticity.

### (3) Control of protein function

#### ① Development of efficient synthetic route to RK682 enamide derivatives and analysis of its interaction with VHR

Protein phosphatase VHR is a member of dual-specificity phosphatase which can de-phosphorylate phospho-serine, threonine, and tyrosine residues. RK682 isolated by Osada's group is a natural product having highly acidic 3-acyltetronic acid structure and shows potent VHR inhibitory activity. We succeeded to develop non-acidic RK682 enamide derivatives (RE derivatives) as a novel type of VHR inhibitor based on RK682. This year, we established the synthetic methodology for large scale-preparation of RE derivatives. Molecular modeling for VHR-RE complex suggested that RE derivatives could bind to catalytic site of VHR. Collaboration with Osada's group on the X-ray crystallographic analysis of this complex is currently underway.

#### ② Interaction analysis of target proteins and small molecules (bioprobes)

Glyoxalase I catalyzes the conversion of methylglyoxal and glutathione (GSH) to S-D-lactoylgutathione. Previously, we have discovered that methyl-gerfelin (M-GFN), the methyl ester of the natural product gerfelin, suppresses osteoclastogenesis and targets GLO1 as inhibitor. In this year, we focused on the interaction between the M-GFN and its target protein GLO1. We carried out the crystallization of GLO1 complexes with methyl-gerfelin and analyzed its structure. The crystal structure analysis revealed that gerfelin is bound in the substrate pocket by coordinate bonding with zinc ion as catalytic metal. In the structures of GLO1 complexed with other inhibitors previously reported, GSH moiety of inhibitors interacted with residues by hydrogen bond. On the other hand, M-GFN interacts with residues by hydrophobic interaction at the region.

### (4) Development of fluorescent proteins

#### ① Fast-photoswitching mutants of Dronpa

Dronpa absorbs blue light and emits bright green fluorescence. It can also be converted by strong irradiation at 490 nm to a nonfluorescent state, which can then be switched back to the original emissive state with irradiation at 400 nm. Through semirandom mutagenesis studies, we have developed two mutants of Dronpa that show efficient photoswitching kinetics. Compared to Dronpa, the mutants can be turned off by blue light more efficiently. Thus, excitation with an argon laser line (488 nm) makes the mutants

quickly become dark such that no substantial fluorescence signals can be observed. Excitation with a violet laser diode (405 nm) also produces no fluorescence signals. Simultaneous 488- and 405-nm irradiation, however, results in a rapid oscillation between the two states, thereby keeping the emissive state population large enough to produce sufficiently bright fluorescence signals.

### ② Light-dependent regulation of structural flexibility in a photochromic fluorescent protein

The structural basis for the photochromism in the fluorescent protein Dronpa is poorly understood, as the crystal structures of the bright state of the protein did not provide an answer to the mechanism of the photochromism and structural determination of the dark state has been elusive. We performed NMR analyses of Dronpa in solution at ambient temperatures to find structural flexibility of the protein in the dark state. Light induced changes in interactions between the chromophore and  $\beta$ -barrel are responsible for switching between the two states. In the bright state, the apex of the chromophore tethers to the barrel by a hydrogen bond and an imidazole ring protruding from the barrel stabilizes the plane of the chromophore. These interactions are disrupted by strong illumination with blue light and the chromophore, together with a part of the  $\beta$ -barrel, becomes flexible, leading to a nonradiative decay process.

### ③ GFP-like proteins from *Anthozoa* stably accumulate in lysosomes

The novel GFP-like proteins from *Anthozoa* have greatly advanced our technologies for fluorescently labeling cells, organelles, and proteins. It has been shown, however, that some GFP-like proteins have a tendency to aggregate. Transfection of GFP-like proteins into cultured mammalian cells results in bright punctate structures (fluorescent dots), which are thought to be cytosolic protein aggregates. In this study, we demonstrate that these dots are not cytosolic aggregates but lysosomes that have accumulated the GFP-like proteins. Our biochemical and immunocytochemical experiments have revealed that certain GFP-like proteins expressed in the cytosol enter lysosomes possibly by an autophagy-related mechanism, but retain their fluorescence because of resistance not only to acidity but also to lysosomal proteases. Fluorescent dots were formed in the autophagy-deficient cells as seen in wildtype cells. Cell biological studies are now underway to determine if a new type of autophagy or other cellular process is involved in the accumulation of GFP-like proteins in lysosomes.

## 2. Molecular ensemble analysis research

### (1) Studies on local electronic state in molecular systems using synchrotron radiation

#### ① Cellular signal transduction systems sensing exogenous stimuli

The two-component regulatory system is widely distributed in bacteria, fungi and plants. It is well known that sensory histidine kinases (HK) sense individual environmental stimuli, and the cognate response regulators (RR) transduce their signals downstream upon receiving the phosphoryl group. However, it has been still unknown how HKs are autophosphorylated upon ligand-binding, and how RRs are activated upon phosphorylation.

(i) We successfully to obtain crystal structures of the catalytic domain of thermophilic bacterial HK in the absence and presence of several kinds of nucleotides. It was found that the core structures are rigid, but the loop covering the ATP binding site is very flexible. On the basis of the structural comparison between these structures and the catalytic domain structure in the HK/RR complex, which was determined last year, we discussed the mechanism of the autophosphorylation reaction.

(ii) *Corynebacterium diphtheriae* is a causative agent of diphtheria. Heme oxygenase (HmuO) is involved in iron acquisition from the host heme that has been transported thorough an ABC-type heme transporter. We indicated that the chrS protein which was produced in the *E. coli* membrane catalyzed heme-dependent autophosphorylation reaction. Protoporphyrin and its Co and Zn complexes failed in the kinase activation, suggesting that ChrS is a specific sensor for the heme.

#### ② Chemical understanding of molecular structures of proteins/prosthetic groups

We have more than 30 structures of GFP-like proteins. To understand their fluorescent properties (color, intensity, and so on) on the structural basis, we started collaborative work on quantum chemical calculation of electronic structures of the chromophores with the groups in Kyoto University

#### ③ Inter- and intra-molecular electron distribution mapping of molecular crystals and proteins by synchrotron X-ray

In order to elucidate a relationship between structure and molecular function, Takata structural materials science laboratory conducts research on visualizing experimental electrostatic potential based on the electron distribution as well as inter- and intra-molecular electron distribution by analyzing synchrotron X-ray diffraction data with maximum entropy method (MEM). In the 2007 fiscal year, we have done intense studies on three themes divided according to target materials. To achieve their respective purposes, it is necessary to collaborate closely with the other RIKEN laboratories. In fact, the research themes i and iii are carried out with Kato condensed molecular materials laboratory, theme ii with Hou organometallic chemistry laboratory, respectively.

(i) Structural investigation of molecular-based superconductor under high pressure and ultra low temperature

In order to investigate structural aspects of a molecular-based material  $\text{EtMe}_3\text{P}[\text{Pd}(\text{dmit})_2]_2$  in superconducting state, we are developing an X-ray diffraction system under multiple extreme conditions. This year, we installed a helium 4 continuous flow cryostat which can refrigerate clamp type pressure cell with beryllium window. Diffraction from specimen under high pressure and

ultra low temperature below 1.5 K was made sure to be detectable. Structural investigation of  $\text{EtMe}_3\text{P}[\text{Pd}(\text{dmit})_2]_2$  in superconducting state will be implemented by optimizing preparatory pressure of the clamp cell at room temperature. In addition, we are also developing experimental techniques of X-ray magnetic diffraction so that one may conduct magnetic structural investigation of molecular-based materials not suited for neutron diffraction.

(dmit = 1,3-dithiol-2-thione- 4,5-dithiolate)

(ii) Visualization of metal-containing protein by using anomalous small-angle X-ray scattering method

Small-angle X-ray scattering (SAXS) method is a powerful tool to explore the structural information about protein molecules in solution and enables us to obtain the structural information with respect to molecular size, shape, and aggregate form. In addition, using anomalous dispersion effect of the element in SAXS, the structural information about metal-containing protein can be separated into molecular shape and spatial distribution of metal elements in the protein. It is so-called anomalous SAXS (ASAXS) method. Moreover, visualization techniques from reciprocal space to real space, employed the reverse Monte Carlo (RMC) and maximum entropy method (MEM), are also developed. The combinational approach of structural information obtained by ASAXS in solution and electronic state obtained by soft X-ray spectroscopy becomes novel structural and functional studies of protein molecules. Ferritin having metal-storage function is 480 kDa molecular weight, and has globular shaper with 8 nm inner diameter and 12 nm outer diameter. The metal-storage process in Ferritin is not fully understood. This year, we have established to control the number of iron atoms into a ferritin molecule. We also have developed the simulation software for SAXS calculation taking into account for the anomalous dispersion effect and have confirmed that the structural information about the metals in the metal-containing protein can be obtained from ASAXS simulation. The surfactant-grafted gold nanoparticles has also been studied by ASAXS measurement, and it is undergoing analysis.

Furthermore, applying the MEM to X-ray single crystal structural analysis, the high-resolution visualization of electron density distribution around the active site in a metal-containing protein leads novel structural and functional studies of protein molecules. This year, we have qualitatively considered that the MEM analysis applies for an X-ray single crystal diffraction data of metal-containing protein. [Ni-Fe]Hydrogenase has a molecular weight of 97 kDa and obtained high-resolution structural model has been studied. As the result, the MEM analysis applied for X-ray single crystal diffraction data improves the electron density map around the active site. However, the number of electrons of the metal atom at the active site in a protein molecule was not extracted correctly because the completeness of data set and accuracy of structural model was not sufficient. We need further improvement of this technique through the analysis of a standard sample which has relatively small molecular weight such as Myoglobin. In addition, we try to investigate the mechanism of chemical reaction in rare earth metal hydride clusters by the MEM analysis with Hou organometallic chemistry laboratory.

(iii) Direct observation of charge transfer in molecular conductor by using Maximum entropy method and static potential mapping

The purpose of this research is to investigate the origin of the metal-insulator transition of molecular conductor,  $\alpha\text{-(BEDT-TTF)}_2\text{I}_3$ . To do this research, we perform a powder-diffraction experiment and deduce the electron density map using the maximum entropy method (MEM). In this year, we have obtained the reliable powder-diffraction data of 30, 110, and 160 K at BL02B2, Spring-8. From the MEM/Rietveld analyses, the electron density maps of  $\alpha\text{-(BEDT-TTF)}_2\text{I}_3$  were deduced. Comparison of the low temperature phase charge density with the one in the high temperature phase revealed that the C=C bond lengths change through the metal-insulator transition. This suggested that the charge transfer occurs between BEDT-TTF molecules because the C=C length reflects the charge amplitude of the BEDT-TTF molecule. The charge order of the lower phase was also revealed from the dimerization of C=C bond length. The mechanism of this charge transfer will be illustrated through the analyses of the static potential mapping, which is in progress.

(BEDT-TTF = bis(ethylenedithio)tetrathiafulvalene)

#### ④ Soft X-ray emission study on myoglobin

We succeeded to measure the high-resolution soft X-ray emission spectroscopy of myoglobin solutions in the last year. We found the obtained resolution is about the half of the designed resolution. We resolved this problem by making the new grating that has a smooth surface roughness. The d-d excitation spectra in the soft X-ray emission spectra of myoglobins have been elucidated by Tanabe-Sugano diagram. We found the lowest d-d-excitation peak exhibit strong linear polarization correlation between incident and emitted photons. The result can not be elucidated by Oh symmetry of the simple Tanabe-Sugano diagram, but well elucidated by the cluster calculation using the distorted D4h symmetry around the Fe ion.

## (2) Studies on biomolecular function using NMR

### ① New methodological approaches for NMR studies of larger proteins and protein complex systems

Despite its potential advantages in analysis, long duration of measurement and limited digital resolution in indirectly observed dimensions prevent 4D NMR experiments from being used in protein NMR projects routinely. The benefits of the nonlinear sampling scheme and 3D maximum entropy processing were demonstrated in 4D triple-resonance experiments. We succeeded in

measuring 4D spectra of equivalent quality with approximately 1/5 duration, when compared with employing a conventional sampling scheme. 4D spectra with much higher resolution can be obtained by extending the acquisition time for indirectly observed dimension in combination with nonlinear sampling scheme. Similar approaches for rapid NMR measurement can be used to overcome problems caused by the instability and the low sensitivity of living cells. By applying nonlinear sampling scheme in triple-resonance 3D NMR experiments, we obtained backbone and side-chain resonance assignments of *Thermus thermophilus* HB8 TTHA1718 protein in *E. coli* cells. Further, the world first three-dimensional protein structure was successfully calculated on the basis of NOE-derived structural information obtained in living environment.

## ② Interaction of protein-protein and protein-substrate evaluated by NMR and X-ray small angle scattering techniques

ssDNA region generated as a result of DNA damage is immediately coated by ssDNA binding protein (SSB). RecA protein that catalyze recombinational DNA repair can not bind the ssDNA. RecF, RecO and RecR proteins enables RecA to bind to the ssDNA, which process contains various protein-protein and protein-DNA interactions. By using NMR and electron microscopy techniques, we have demonstrated that RecO displaces SSB on ssDNA to form ssDNA-RecO-SSB complex and that RecR interaction with RecO in the complex causes to release SSB from RecO. When RecF, RecO and RecR proteins existed at the same time, RecFR complex was formed dominantly. We have indicated that two RecF and four RecR molecules form ring like structure by using small angle X-ray scattering. The internal diameter and the distribution of positive charges strongly suggested that RecFR binds DNA inside the ring. Therefore, we proposed a model in which RecFR complex move on dsDNA and interact with ssDNA-RecO-SSB to recognize dsDNA-ssDNA junction.

## (3) Studies on local magnetic states of functional molecular systems

### ① Single-spin detection using STM

Detection and control of local magnetic properties are important for spintronics applications. So far, scanning Hall-probe microscopy and magnetic-force microscopy have been used to investigate local magnetic properties but their spatial resolutions are limited down to several  $\mu\text{m} \sim \text{nm}$ . Once atomic spatial resolution has been achieved, detection and manipulation of single spin may become possible. In order to resolve single spin, we have been developing two spin-sensitive scanning tunneling microscopes. First one is the electron-spin-rotation (ESR) STM in which spin precession in a magnetic field is detected through AC component (at a Larmor frequency) of the tunneling current in the vicinity of individual spins. We constructed and tested the ESR-STM system. We have found that acoustic and vibration noises in the experimental room affect the system. Therefore, we have relocated the system to the quieter room. In addition, we have added a load-lock chamber to improve the throughput of the measurement. Another single-spin detection scheme which we are developing is inelastic-tunneling spectroscopy under a magnetic field. In this method, we detect excess (inelastic) tunneling current which flows at above the bias voltage corresponding to the Zeeman energy of the localized spin. We will use these two methods complementary to detect the spin of the single molecule.

### ② Spin-spin interaction studied by the reaction yield detected and optically detected magnetic resonance

The electron carriers in organic electronic devices are positive and/or negative radical ions. The radical ion has an electron spin due to an odd electron. At the interface of the electrodes, the radical ion pair is generated. They are in the singlet or triplet spin states and their charge recombination are largely dependent on their spin multiplicity. Manipulating this spin multiplicity by the technique of electron spin resonance affords us to control the dynamics of radical ion pair and thus to elucidate the electron transfer process in the organic semiconductor.

This year, we have investigated the emission process of polymer electroluminescent material, a polyphenylenevinylene derivative. The observation by pulsed constant current condition gave the similar results by pulsed constant voltage condition. Thus we will move to the constant current condition because the injected number of electrons becomes constant. The magnetic field and resonant microwave dependences of the emission intensity after the removal of driving voltage was found to be fairly larger than that in the presence of electric field. We conclude that the electric field increases the exchange interaction between the radical ions. This suggests that the reason of large magnetic field effects in organic EL emission is not the long lifetime of radical ion pair to enhance the interaction with the magnetic field, which is frequently observed in liquid phase, but the long range of charge recombination to reduce the exchange interaction. We started the EL emission image measurements. In the total emission, the brighter (i.e. higher driving voltage), the smaller magnetic field effects. At a certain driving voltage, there were no significant difference in the magnitude of the magnetic field effects at brighter and darker positions.

## (4) Spectroscopic studies on functional molecular systems

Exploring new phenomena at liquid interfaces by new even-order nonlinear spectroscopy

We are developing interface-selective even-order nonlinear spectroscopies to explore new frontiers of interfacial science. We studied two subjects in this year. First, we applied our newly developed multiplex Electronic Sum Frequency Generation (ESFG) technique to study surface denaturation of proteins. When a protein molecule reaches the air-water interface, there is a strong tendency of the hydrophobic parts of the protein to go to the air side leading to the unfolding of the protein. This phenomenon is called 'surface denaturation' and has been well known in natural science. Although the characterization of structure and

conformation of many proteins have been done in the bulk, the *in situ* study of protein conformation at an interface has not been done due to lack of a suitable interface-specific technique. Second-order nonlinear spectroscopy is a powerful tool to study molecules at interfaces. Here, we used ESFG for *in situ* characterization of the protein conformation at an interface. We measured the ESFG spectra of a protein, cytochrome c, at the air-water and silica-water interfaces and correlate them to the conformation of the protein at the interfaces for the first time. The existence of multiple conformations of cytochrome c at the air-water interface was found under both neutral and acidic conditions. In contrast, at the silica-water and silica-air interfaces, no denaturation was detected. Second, we demonstrated femtosecond Time-Resolved ESFG (TR-ESFG) spectroscopy that can provide interface-selective transient electronic spectra with an unprecedentedly high signal to noise ratio and dense spectral data points. The TR-ESFG spectra of rhodamine 800 (R800) at the air/water interface were obtained, and the interfacial dynamics of photoexcited R800 was investigated as thoroughly as the bulk dynamics was studied with the conventional transient absorption spectroscopy. At the air/water interface, the dimer of R800 in the lowest excited singlet ( $S_1$ ) state either dissociates into the  $S_1$  monomer or nonradiatively decays to the dimer in the ground state with the time constant of 0.30 ps that is ten times shorter than in the bulk. The  $S_1$  monomer at the interface shows a double-exponential decay with the time constants of 6.0 ps and 0.82 ns. The latter time constant is nearly equal to the  $S_1$  lifetime of the monomer in bulk water. The former is due to interface-specific relaxation that is not found in the bulk.

#### **(5) Development of SR spectroscopy under multi-extreme conditions**

A multiple-extreme conditions setup is being developed for SR investigations of molecular materials at the RIKEN-RAL Muon Facility which has been established at the Rutherford-Appleton Laboratory (RAL) in the UK. The setup makes SR experiments of molecular materials under multiple-extreme conditions possible, such as high pressure, small samples, ultra-low temperatures, light irradiations and so on. In 2007, a new SR spectrometer for the multiple-extreme conditions has been developed. The spectrometer possesses large enough rooms to accommodate multiple-extreme conditions and more than 600 muon counters which are about 3 times as larger numbers as those of the existing spectrometer at the RIKEN-RAL Muon Facility. The new spectrometer makes speedy and effective measurements possible even though small samples are used. Developments of new counters are being going on as well. Due to the large numbers of muon counters, the size of each counter was made small. The wave-length shifter was adopted to transmit photons to a photo-multiplier. This new system keeps the counting rate high enough even though the size of a muon counter is small. The performance of the muon-counting system has been checked using real muon beams to be satisfied.

A gas-pressurized high-pressure SR system has been developed. An advantage of this system is that the pressure can be changed continuously changing the gas pressure from 0 to 0.64 GPa without any change of sample conditions. This advantage makes effective and speedy experiments possible rather than cases using a usual cramp-type hydrostatic pressure cell. A special high-pressure cell which is dedicated to the pulsed-muon beam has been made under the collaboration with the RAL high-pressure group. The maximum pressure of 0.64 GPa has been tested and confirmed. The whole system has been tested at low temperatures and will be used for real experiments at the RIKEN-RAL Muon Facility from April 2008.