

# 液中レーザーアブレーションを利用した原始的酵素様物質の発生

大阪大学 大学院工学研究科

准教授 焼山 佑美

(2018年度 奨励研究助成 (若手研究者) AF-2018234-C2)

キーワード：液中レーザーアブレーション, Fe-S クラスター, 配位性有機分子

## 1. 研究の目的と背景

鉄-硫黄結合 (Fe-S 結合) は、地球上に多く存在する黄鉄鉱 ( $\text{FeS}_2$ ) を初めとして、また生体内においてもヒドロゲナーゼなどの酵素活性中心、すなわち鉄-硫黄クラスターとして広く見られる。これら Fe-S クラスターは、酸化還元反応により単純な分子をより複雑な分子システムへと進化させる触媒として働き、生体内の代謝を担っていることから、モデル系の構築によりその性質を解明・単純化すれば、「単純なペプチドに囲まれた金属クラスター」という、初期の原始的な酵素様物質まで遡ることで、単純な有機物の化学的進化による原始生命の誕生についての情報を探ることも可能と考えられる。しかし、こうした Fe-S クラスターは、一般に酸素に対し非常に不安定であり、その合成には厳密に管理された嫌気条件下での慎重な操作が求められる。このことは上記の研究推進を妨げる大きな原因となっている。

一方、原始地球の環境では、 $^{235}\text{U}$  濃度が  $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$  比にして 3.5% と、現在の地球環境 (0.79%) と比べて非常に高かったことが明らかとなっている<sup>1)</sup>。これは、原始地球の地殻中は天然原子炉状態にあったことを示しており、そこで発生する放射線が地下水を介して単純な有機物の化学的進化に必要なエネルギーを供給したと考えられている<sup>2)</sup>。放射線と同等のエネルギーは 800 nm レーザー照射でも与えられるとされており、実際に放射線による DNA の物理的損傷現象の研究で利用されている<sup>3)</sup>。また、レーザー照射による金属クラスター形成法、すなわち液中レーザーアブレーション法は金属単体から金属クラスターを直接合成できる方法として有用であり、界面活性剤水溶液中の貴金属<sup>4)</sup>や、気相中での黄鉄鉱<sup>5)</sup>に対し、レーザー照射によって金属ナノクラスターが得られることが報告されている。このことはさらに上記を結びつけ、初期の原始的な酵素様物質の合成、及びレーザー照射による高エネルギー供与による低分子量有機物の化学進化過程を明らかにするチャンスを与えてくれる。

そこで筆者らは、上記の背景を基に、原始地球を模倣した反応条件として、黄鉄鉱をターゲットに FeS 含有酵素のタンパク質部分の部分構造となり得る有機物を含む液中に沈め、1064 nm Nd:YAG レーザーを用いて液相レーザーアブレーション法を行った。これより Fe-S クラスター合成にかかる困難を排し、原始的酵素様物質となりうる低分子量有機物保護 Fe-S クラスターの発生を目指した。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験装置の概要

図 1 に、液中レーザーアブレーション実験に用いたセッティングの模式図を示した。光源には 1064 nm Nd:YAG レーザー、ターゲットにはパイライト ( $\text{FeS}_2$ ) を用いた。ターゲット内には回転子が取り付けられており、アブレーションの間は回転して常に同じ面にレーザーパルスが当たり続けられないように実験を行った。実験に際しては、反応容器としてパイレックスガラス製のスクリューバイアルを用い、イオン交換水、または臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) やラウリル硫酸ナトリウム (SDS) といった界面活性剤水溶液、エタノール、トルエン、アセトン等の有機物を溶媒に用いた。実験に用いたレーザー仕様は 100 mJ/pulse、繰り返し周波数は 10 Hz とし、15 分間照射した。

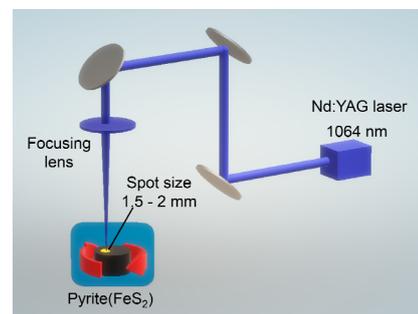


図 1. 実験セッティングの模式図

## 3. 実験結果

### 3.1 ナノ粒子組成の溶媒依存性<sup>6)</sup>

溶媒として、10 mM SDS 水溶液、1 mM CTAB 水溶液、エタノール、アセトン、トルエンを用いて室温空気下にて検討を行った。まず SDS および CTAB 水溶液中でレーザーアブレーションを行ったところ、CTAB 水溶液中で 2 nm 程度のナノ粒子の生成が観測された (図 2)。ラマン分光分析の結果、得られたピークが一般的なヘマタイト  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ( $415, 295, 225 \text{ cm}^{-1}$ ) と良く一致することがわかった (図 3)<sup>7)</sup>。わずかに高波数側へとシフトしているのは、ナノ粒子のサイズによるもので、一般に粒径サイズが小さくなると、ラマンピークのブロード化に加え、低波数側へのシフトが観測される事が知られている<sup>8)</sup>。

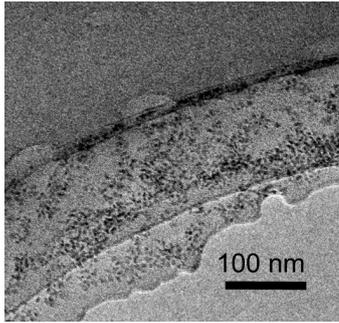


図 2. CTAB 水溶液中での液中レーザーアブレーションにより得られたナノ粒子の TEM 画像.

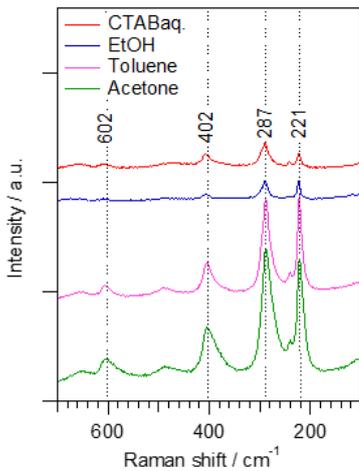


図 3. CTAB 水溶液または有機溶媒中での液中レーザーアブレーションにより得られたナノ粒子のラマン分光スペクトル.

次に、エタノール中でのレーザーアブレーションを行った。得られた反応溶液の TEM 観察の結果、広いサイズ分布を持つコアシェル状のナノ粒子が生成していることが分かった (図 4a)。このような広いサイズ分布は、既に報告されている鉄をターゲットにした液中レーザーアブレーションでも観測されている<sup>9)</sup>。また、トルエンを用いた場合には、アモルファスカーボンで覆われたナノ粒子が生成していることがわかった (図 4b)。このことは、レーザーアブレーション中、溶媒が分解し、さらにその分解物がナノ粒子表面上で凝集したことを示している。これらはともにラマン分光分析よりヘマタイトと良い一致をするスペクトルを与えた (図 3)。

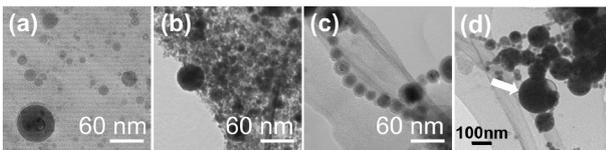


図 4. (a) エタノール, (b) トルエン, (c) (d) アセトン中での液中レーザーアブレーションにより得られたナノ粒子の TEM 画像.

一方、アセトンでレーザーアブレーションを行ったところ、他の溶媒系とは異なる結果が得られた。TEM 測定では、二種類のナノ粒子が観測された。主生成物はエタノールやトルエンの場合と同様のコアシェル型ヘマタイトナノ粒子であったが (図 4c)、これに加え図中、矢印で示したように副生成物としてコアシェル型ではないナノ粒子も観測された (図 4d)。これらの混合物溶液についてラマン分光測定を行うと、そのスペクトルはヘマタイトナノ粒子のものと良い一致を示した。さらに主生成物であるコアシェル型ナノ粒子について、制限視野電子回折 (SAED) により観察したところ、マグネタイト  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  の (4 4 0), (4 0 0), (3 1 1) 面に由来する反射が観測された (図 5a)。しかし、ヘマタイト由来の反射は観測されなかったことから、コアシェル型のナノ粒子の組成は、コア部分がヘマタイト、シェル部分がマグネタイトであると考えられる。また、コアシェル型ではないナノ粒子について TEM-EDX 測定を行ったところ、鉄と硫黄のみが検出された (図 5b)。

この生成機構については未だ詳細は明らかでないが、アセトンの配位性がこれらのナノ粒子生成と安定化に重要な役割を果たしていることが想定される。

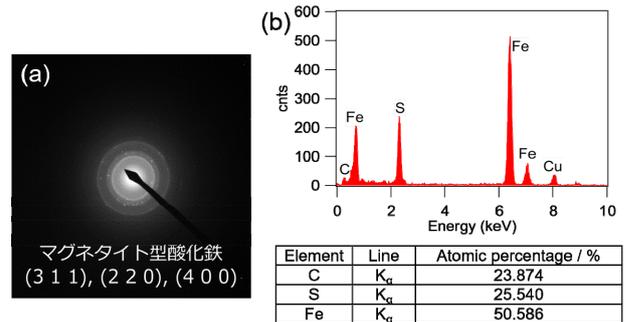


図 5. アセトン中での液中レーザーアブレーションで得られた (a) コアシェル型ナノ粒子の SAED パターン, (b) マイナー成分ナノ粒子の EDX 分析結果.

### 3.2 配位性有機物存在下での液中レーザーアブレーション

上記の成果を元に配位性有機分子を共存させる事で、目的とする Fe-S クラスタやその前駆段階にあるナノ粒子の安定化を図る事を期待し、種々のアミノ酸やチオカルボン酸 2~8 や、含硫黄アミノ酸であるシステインを含むトリペプチドとしてグルタチオン 1 を水中に共存させた状態でのアブレーション実験を行った。図 6 に実験に用いた有機分子の構造を示した。

まずグルタチオン 1 について濃度を 0.1 M, pH 8.8 とし、レーザーパワーを 0.3 mW, 繰り返し周波数は 10 Hz とし、窒素雰囲気下 10 分間照射を行った。得られた溶液について UV-vis スペクトルを測定すると、鉄硫黄クラスター錯体が吸収を持つとされる 300-400 nm 付近の吸収がほとんど観測されなかった (図 7a)<sup>10)</sup>。そこで、測定後 UV セルのキャップを開けて空気中にさらしたところ、

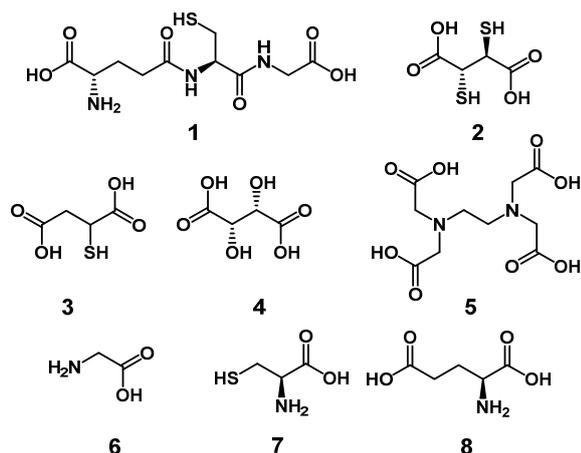


図 6. 本研究で用いた配位性有機物の分子構造.

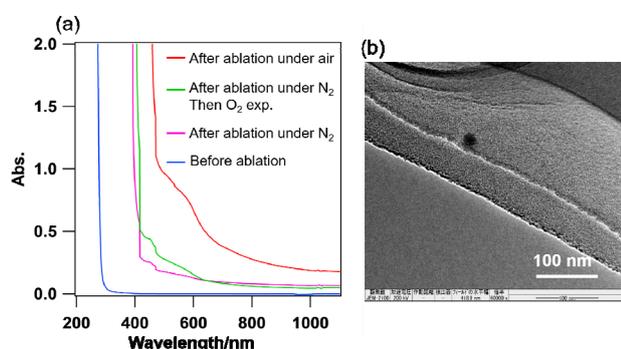


図 7. アブレーション後の反応溶液の (a) UV-vis スペクトル. (b) TEM 画像.

300-400 nm 付近にブロードなピークが観測された. このピークは鉄含有錯体 LMCT 由来と考えられ, グルタチオン存在下でのレーザーアブレーションにより, グルタチオンと錯形成した何らかの錯体が得られたものと考えられる. また, これまでとは異なりヘマタイトナノ粒子の生成が抑制されていた (図 7b). このことは配位性分子存在下では, 鉄酸化物ナノ粒子の生成が抑制される事を表している. そこで, 引き続きその他の分子存在下でも, 空気下で液中レーザーアブレーションを行うことで, 何らかの錯体生成が生じることを期待して実験を行った. なお, pH は, 既知の pKa 値を元に, チオールを含む化合物 **2**, **3**, **7** の場合, ジカルボキシレートもしくはカルボキシレートとチオラートが 1:1 で生成する条件, チオールを含まない化合物 **4**, **5**, **6**, **8** の場合は, カルボキシレート, もしくはジカルボキシレートが 0.5 当量存在する条件に設定した. その結果ジメルカプトはく酸 **2**, メルカプトはく酸 **3** 水溶液でのみ, アブレーション後の UV-vis スペクトルにおいて, グルタチオン存在下でのアブレーション結果と同様に, 可視光領域に強い吸収のある化合物が生成した (図 8). pH 依存性についてより詳細な影響を明らかにするために, **3** を用い, 同様のレーザー照射条件にて, 種々の pH 条件で

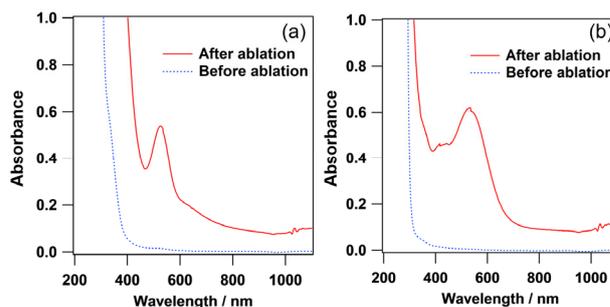


図 8. (a) **2** および (b) **3** を含む水溶液中での液中レーザーアブレーション前後での UV-vis スペクトル変化.

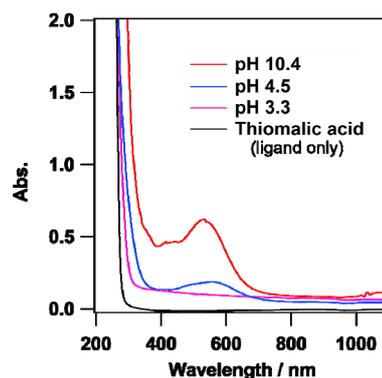


図 9. **3** を含む水溶液中での液中レーザーアブレーションによる鉄錯体形成にかかる pH 依存性.

のアブレーションを検討した. **3** は鉄イオンへと配位可能な 2 つのカルボキシル基と 1 つのチオール基を有しており, どちらが (もしくは両方が) 配位に関与するかは脱プロトン化にかかる pH に大きく依存する. その結果, pKa 10.4, すなわち, ジカルボキシレートと, チオラートが 1:1 で生成する条件において, レーザーアブレーション後, 400-600nm 付近で吸光度の増大が見られた (図 9). この UV 吸収は, 配位子である **3** から鉄イオンへの LMCT に由来するものと考えられ, 鉄錯体の生成を示唆している. なお, いずれの場合もナノ粒子の生成は確認できなかった.

### 3・3 電気泳動によるアブレーション生成物の同定

ここまでで得られた鉄錯体は, 混合物であると考えられ, それらの分離・同定をゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) や電気泳動をはじめ, 数々の手法をこころみても, 分離が困難であった. そこで, 化合物 **1**~**3** 存在下, 40 分間のレーザーアブレーションにより得られた水溶液をそのまま電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル測定と ESI-TOF-MS スペクトル測定に供することで, 生成物の構造に関する知見を得る事を試みた. ESR 測定の結果, いずれも  $g = 4.3$  のシグナルを与えたことから, 今回得られた錯体が六配位鉄錯体で, 非対称な配位環境を有していることが示唆された (図 10, 11).

また ESI-TOF-MS 測定では, **3** を用いた場合  $m/z$  624 に

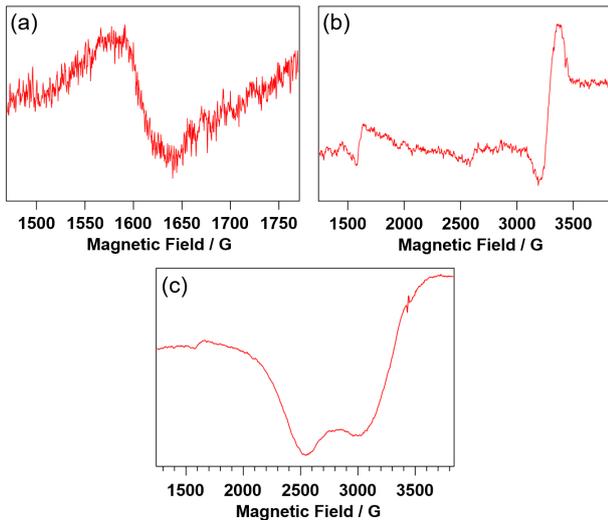


図 10. (a) **1**, (b) **2**, (c) **3** を含む水溶液中での液中レーザーアブレーションにより得られた溶液の ESR スペクトル.

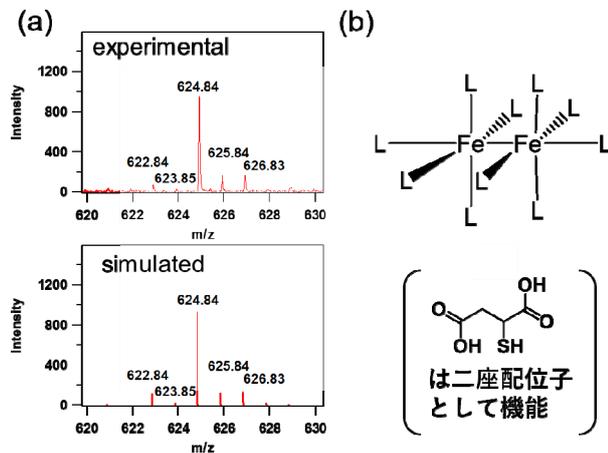


図 11. (a) **3** を含む水溶液中での液中レーザーアブレーションにより得られた溶液の ESI-TOF-MS スペクトル. (b) ESI-TOF-MS 測定結果から推測される鉄錯体の構造.

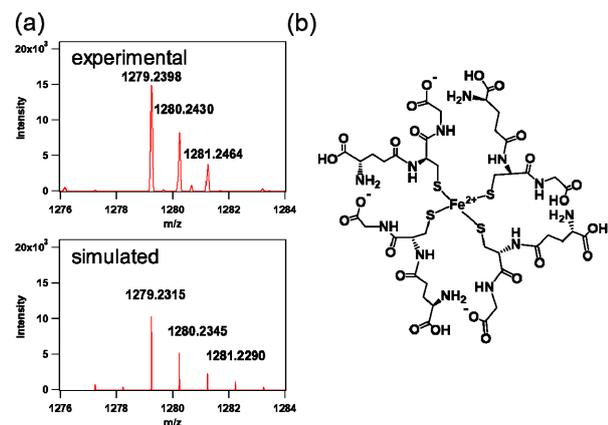


図 12. (a) **1** を含む水溶液中での液中レーザーアブレーションにより得られた溶液の ESI-TOF-MS スペクトル. (b) ESI-TOF-MS 測定結果から推測される鉄錯体の構造.

ピークが検出され、同位体パターン解析の結果、これが 2 核の鉄イオンに対し 3 分子の **3** が 2 座で配位し、ヒドロキシ基が 4 つ付いた錯体であることが強く示唆された (図 11). さらに、**1** を用いた場合については、4 分子の **1** が配位した単核錯体である事が示唆された (図 12).

#### 4. まとめ

本研究では、パイライトをターゲットとした液中レーザーアブレーションによる酵素様物質の合成を目指し、まずアブレーションにかかる溶媒依存性について、界面活性剤水溶液や種々の有機溶媒を用いて検討を行った。その結果、ほとんどの溶媒系ではヘマタイトナノ粒子のみを与えたのに対し、アセトン中では、minor product として鉄硫黄ナノ粒子が生成することを見出した。そこでさらにアブレーション条件下で共存する分子の配位特性が、鉄硫黄ナノ粒子の安定性に対し、どのように影響するかを明らかにするため、低分子ペプチドを含む種々の配位性有機分子存在下での水溶液中でのアブレーション実験を行った。その結果、含硫黄有機分子中でのみ、鉄錯体の混合物を与えることを確認し、その生成量が pH の変化に応じて変化する事を見いだした。現時点では鉄単核の錯体のみが検出されており、鉄硫黄クラスターを含む錯体は検出されていない。その原因としてもっともあり得るのが、生成物の不安定性による分析プロセス中での分解である。今後、その場観察実験も視野に入れ、反応条件および分離・同定プロセスのさらなる検討を行う。

#### 謝 辞

本研究は公益財団法人天田財団の奨励研究助成のご支援を受けて実施しました。深く感謝致します。本研究の成果は実際の実験・解析を担当して下さった大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 本橋優香 氏の不断努力の賜です。また、共同研究者である同大学院工学研究科 櫻井英博 教授、大阪大学レーザー研究所 猿倉信彦 教授、清水俊彦 准教授、南 佑輝 特任研究員、東京大学大学院総合文化研究科 真船文隆 教授、中央大学理工学部 岡島元 准教授、青山学院大学理工学部 坂本 章 教授に深く感謝致します。ESI-TOF-MS 測定と化合物の同定に関し多大なサポートを賜りました大阪大学大学院理学研究科技術部 伊藤彰厚 氏に深く感謝致します。最後に、マイクロチップレーザーを快く貸与下さった理化学研究所放射光科学研究センター 平等拓範グループディレクターに心よりお礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Z. Adam : *Astrobiology*, 7 (2007), 852.
- 2) S. Ebisuzaki, S. Maruyama : *Geosci. Front.*, 8 (2017), 275.
- 3) J. A. Dharmadhikari, A. K. Dharmadhikari, K. C. Kasuba, H. Bharambe, J. S. D'Souza, K. D. Rathod, D. Mathur : *Sci. Rep.*, 6 (2016), 27515.

- 4) H. Muto, K. Yamada, K. Miyajima, F. Mafuné : *J. Phys Chem. C*, 111 (2007), 17221.
- 5) S. M. Lang, K. Miyajima, T. M. Bernhardt, F. Mafuné, R. N. Barnett, U. Landman : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20 (2018), 7781.
- 6) Y. Motohashi, Y. Yakiyama, F. Mafuné, H. Okajima, S. Sakamoto, T. Shimizu, Y. Minami, N. Sakrukura, H. Sakurai : *Chem. Lett.*, 48 (2019), 712.
- 7) C. J. Letti, L.G. Paterno, M. A. Pereira-da-Silva, P. C. Moraisa, M. A. G. Soler : *J. Solid State Chem.*, 246 (2017), 57.
- 8) S. Lian, H. Li, X. He, Z. Kang, Y. Liu, T. Lee : *J. Solid State Chem.*, 185 (2012), 117.
- 9) V. Amendola, P. Riello, M. Meneghetti : *J. Phys. Chem. C*, 115 (2011), 5140.
- 10) B. V. Depamphilis, B. A. Averill, T. Herskovitz, L. Que, R. H. Holm : *J. Am. Chem. Soc.*, 96 (1974), 4159.