

解説

熱力学量の時間分解計測法とその応用

寺嶋正秀

(受取日：2002年9月20日，受理日：2002年10月8日)

Time-resolved Measurements of Thermodynamic Quantities and Applications

Masahide Terazima

(Received September 20, 2002; Accepted October 8, 2002)

Although the thermodynamic quantities are very fundamental and important quantities to describe chemical states, these quantities have been studied only under the equilibrium condition. This limitation was a serious problem for understanding transient chemical processes including photochemical reactions. One challenge facing chemists studying chemical reactions is to obtain thermodynamic information about non-equilibrium states involved in rapid reactions. Several methods we have developed recently for the measurement of the time-resolved thermodynamic quantities were reviewed. Using these methods, we are now able to measure the initial step of the heating process due to the nonradiative transition, enthalpy of reaction, partial molar volume change, thermal expansion coefficient, and heat capacity of transient species.

1. はじめに

物質を記述する上で、生成エンタルピー、部分分子容、熱膨張係数、圧縮率など、熱力学量は基本的な物理量である。当然、物質の変化を表す化学反応においては、これらの熱力学量の変化、例えば反応エンタルピー (ΔH)、部分分子容変化 (ΔV)、熱容量変化 (ΔC) などはその反応を理解するうえで重要な物理量となる。そのため古くから多くの化学反応に対して、こうした量の変化が理論的に扱われ、また実験的に測定されてきたし、現在でもその測定法の改良が進んでいる。しかし、ここで注目すべきは、過渡的現象にほとんどの測定法は適用できないことである。一方で、レーザー分光を主とする過渡吸収や発光検出により、反応の速度論についてはフェムト秒の時間から多くの研究がなされているが、こうした熱力学量との対応は明らかではない。即ち、非平衡状態にある中間体等の熱力学量についての情報はまったく与えられない。我々は非平衡状態にある、

特に光励起後におこる速い化学反応に対して、こうした熱力学量の観点からその特性を明らかにするために、これらの量をレーザー分光法により時間分解測定する手法を開発し、幾つかの単純化学反応あるいは生体蛋白の反応に適用し、他では得られないユニークな情報を得つつある。ここでは、その原理とともに得られた結果を幾つか紹介する。

まず、凝縮体中にある分子を光励起したときにほぼ普遍的に起こることは、光子エネルギーが分子内の振動回転とともに周囲の分子の振動、回転や並進の自由度に移ることであり、最終的にはこのエネルギーは、最も状態密度の高い媒体の並進エネルギーに受け渡されて、いわゆる「熱い」状態になる。この光子エネルギーが熱エネルギーになる現象は、光熱現象として古くからよく知られており、物理、化学、生物、分析、工学など様々な分野で多くの応用が開発されている。¹⁾ところが、その初期に何が起っているのかなど基礎過程に関する理解は、ほとんど進んでいない。例えば、媒体の熱となる速度はどれくらいであるのか。ま

た、どういう機構によってこの初期のエネルギー受け渡しが進んでいるのだろうか。こうした基礎過程に関する理解が進んでいないことの一理由は、熱を高速で捕らえる手法がなかったためである。ここではまず、溶液状態にある分子を、電子励起状態へ光励起した後の溶媒の温度上昇を、ピコ秒からの高時間分解能で捕らえる手法の開発と、得られた結果についての解説を行なう。次に、化学反応で変化する熱力学量を時間分解で検出する手法と、特に生体蛋白質へ適用した例について紹介する。

2. 測定法

従来の分光学的な熱検出法として、輻射検出法 (photothermal radiometry), 光熱干渉法 (photothermal interferometry), 光熱偏向法 (photothermal deflection), 光音響法 (photoacoustic spectroscopy), 過渡レンズ法 (transient lens), 過渡回折格子法 (transient grating), 等がある。^{1,2)} 以下に、ここでは我々が高速熱検出あるいは時間分解熱力学量計測のために開発している手法のベースとなる過渡回折格子 (TG) 法と過渡レンズ (TL) 法についての簡単な説明を行なう。¹⁻⁸⁾

2.1 過渡回折格子 (Transient grating: TG) 法

二つの単色で平行な偏光方向を持つ平面波 $E_i = E_i \exp\{i(\omega t - k_i \cdot r)\}$ ($i = 1, 2$) の交差により、

$$I(r, t) = I_1(t) + I_2(t) + 2\epsilon_0 cn E_1(t) E_2^*(t) \exp(-iq \cdot x)$$

$$I_i = \epsilon_0 cn E_i^2$$

$$q = k_1 - k_2$$

(ここで、 c は真空中の光速、 n は屈折率) という光強度の空間パターンが作られる。(Fig.1)⁹⁾ ここで q はグレーティングベクトルである。励起光の波長を λ_{ex} , 交差角度を θ とすると格子間隔 $\Lambda (= 2\pi/q)$ は

$$\Lambda = \lambda_{ex} / 2 \sin(\theta/2)$$

で与えられる。光強度の強い場所での光励起により、種々の要因により屈折率あるいは吸光度の空間的変調 ($\Delta n, \Delta k$) 即ち格子生成が起こる。この格子による、Bragg 条件を満たす特定の方向への光散乱が、TG 信号と呼ばれ、その強度 (I_{TG}) は

$$I_{TG}(t) = \alpha (\Delta n)^2 + \beta (\Delta k)^2$$

と書かれる。⁹⁾ ここで α と β は、プローブ波長や、励起光の交差角度などの実験条件に依存する定数である。光照射に伴い種々の原因で屈折率変化が起こりうるが、通常の光化学反応を研究するような条件では、次の三つの原因が主に寄与する。^{6,9)}

温度変化：無輻射遷移は、光などの輻射を伴わないで

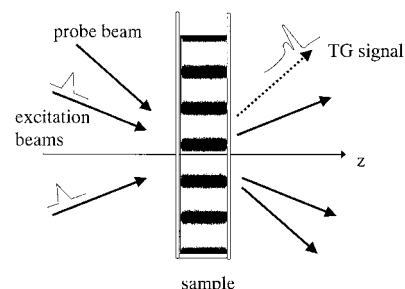


Fig.1 Schematic illustration of the transient grating method.

エネルギーの低い状態へ失活する過程であり、光励起が起こるとほとんどの場合に観測される非常に一般的な現象である。このエネルギー差は、最終的には熱エネルギーとして溶媒に受け渡される。そのため溶液の温度上昇が起こり、屈折率の温度依存性を通して屈折率変化が誘起される。特に速い時間スケールでの発熱に関する TG 信号では、音響信号と呼ばれる正弦的に変化する信号が得られる。これは発熱領域で媒体の膨張が起こり (音波発生)、それが空間的に伝搬するために空間的・時間的に周期的な屈折率変化が生じることによる。例えば、もし、瞬間的に発熱が起こり、音波の伝搬による減衰を無視すると

$$I_{ac}(t) = \alpha \{\Delta n(t)\}^2 = \alpha \{A(1 - \cos \omega t)\}^2$$

と書かれる音響信号が観測される。ここで $\omega = vq$ (v : 音速) であり、その強度 A は発熱量と溶媒の (n/ρ) (ρ/T) に比例する。発熱量が大きいと信号強度が増え、また発熱速度が無視できないと、それだけ音響信号が遅れて立ち上がることになる。よってこの音響信号の波形解析により、放出された熱量やその放出速度が求められる。また、化学反応により反応熱の放出もしくは吸収があると、やはり温度変化が起こり、信号として現われる。

体積変化：もし、反応前後で分子体積が変化すると、系の密度が変化し、屈折率が変化することになる。

吸収スペクトル変化：通常、化学反応が起こると吸収スペクトルが変化する。Kramers-Kronig の関係式からも明らかのように、その影響は屈折率にも現れ、たとえ吸収の無い波長においても、屈折率変化は観測されることになる。

2.2 過渡レンズ (Transient lens: TrL) 法

過渡レンズ法は、ポンプ光によりサンプル中に過渡的なレンズが形成されたと考える描像で理解できる。⁷⁾ ポンプ光断面の光強度分布がガウス型で与えられるとき、ガウス型の屈折率変化が得られ

$$n(r, t) = n_0 - \Delta n(t) \exp(-r^2/w^2)$$

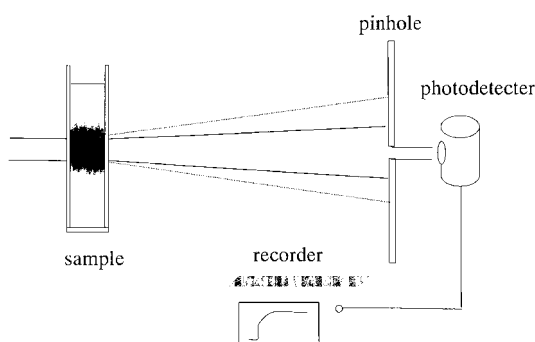


Fig.2 Schematic illustration of the transient lens method. The dark part inside the sample denotes the photo-illuminated region and the refractive index of this region is changed by the photothermal effect and chemical reactions. The solid line and the dotted line indicate the beam paths before and after the creation of the transient lens, respectively. The change of the beam radius by the lens effect is detected as the change of the light intensity passing through the pinhole.

となる。ここで w はポンプ光の半径で、 r は中心からの距離である。このガウス型の屈折率分布はレンズの働きをし、そこを通過する光を広げたり集光したりする (Fig.2) よってパルス光でこの分布を作り出し、その後ある時間でプローブ光の空間的変形をモニターすれば、レンズの焦点距離が測定される。通常この屈折率変化は、発熱による媒体の膨張によって誘起されることが多く、熱を捕えるという意味で「熱レンズ法」と呼ばれてきた。速い時間スケールでは、やはり媒体膨張に伴う音響ピークが見られる。この信号が立ち上がる時間は、普通の実験条件で100ナノ秒ほどかかるため、この時間より長い領域での温度の時間変化を測定できることになる。しかし、我々はこの手法により、熱だけでなく分子体積変化や光励起に伴う屈折率変化、あるいは光の電場による分子配向の寄与も熱と同様に検出できることを示し、それぞれ体積レンズ、ポピュレーションレンズ、光カーレンズと名づけ、この検出手法を過渡レンズ法と呼んでいる。

3. 超高速熱検出法

3.1 温度レンズ、温度グレーティング法

前節で述べた熱検出法は、一般に光熱分光法と呼ばれ、高感度かつ高時間分解能として知られている。しかし、その代表である光音響法や過渡レンズ法、更にはTG法でさえ、熱検出としての速度は遅すぎて、光熱現象の素過程は捕えられなかった。例えば、普通の実験条件ではTG法で

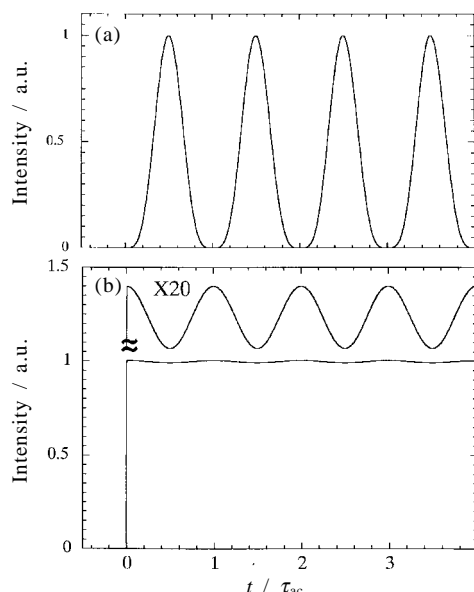


Fig.3 (a) Acoustic signal (corresponding to the density change) and (b) temperature grating signal (temperature change) after the instantaneous heating process at $t = 0$ under the transient grating condition. Acoustic transit time, τ_{ac} is determined by the experimental condition and it is typically in a range of 400 ps ~ 100 ns.

50 ~ 30 ps, いわゆる熱レンズ法で100 nsが測定時間の限界とされていた。最近この時間分解能をTG法で1桁以上、熱レンズ法としては5桁も向上させる、新しい手法が二つ示された。それが、音響ピークシフト法と名づけた手法と、温度グレーティングと温度レンズ法と呼ぶ手法である。

温度グレーティングと温度レンズ法の原理は、温度上昇後の溶液の屈折率変化が、温度 T と密度 ρ を用いて

$$dn/dT = (n/\rho)_T (\rho/T) + (n/T)_\rho$$

と書かれることを利用するところにある。¹⁰⁾ 従来の熱レンズ法やTG音響信号では、この第1項由来の信号を検出していたのであるが、これでは信号の出現に密度変化が必要になり、必然的に密度が照射領域で変化するだけの時間がかかってしまうことになる (Fig.3) この問題点を克服するため、第2項を捕える試みがなされた。この信号が検出されれば、熱検出としての時間分解能は密度変化には影響されず、非常に早くなることが予想される。この信号が検出可能かどうかについては、多くの議論があったが、筆者らは水溶液を用いて、初めて実際に検出できることを示した。^{10,11)} グレーティング法でのこの成分を「温度グレーティング」、過渡レンズ法での成分を「温度レンズ」と名付け

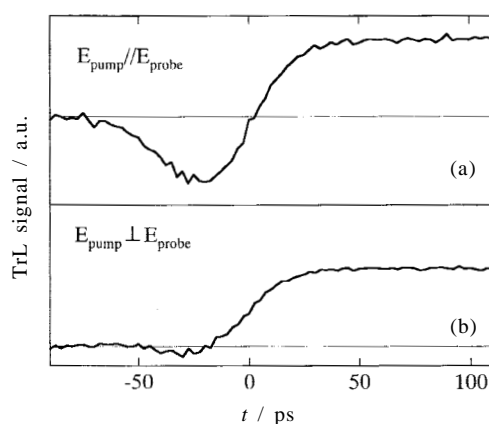


Fig.4 Time profile of the transient lens signal after the photoexcitation of Ni^{2+} in aqueous solution: (a) $I_{//}$, (b) I_{\perp} signals. The signal downward indicates the creation of the convex lens.

た。これに伴い、従来多くの研究者が観測していた熱成分は、「密度グレーティング」と「密度レンズ」と呼んでいる。

3.2 音響ピークシフト法

速い温度上昇の分子論的原因を探るためには、溶質と溶媒の相互作用を変化させて温度上昇の依存性を観測するのが有効と思われる。そのためには、温度グレーティングや温度レンズ法の方法を有機溶媒に適用すれば良いのであるが、(実際に有機溶媒にも適用できるが)^{12,13} 密度変化の項 $(n/\rho)_T (\rho/T)$ が大きくなり、信号の観測が困難になる。このため、溶媒の性質をかえて温度上昇速度を研究するには不向きになる。音響信号の波形解析により、放出された熱量やその放出速度が求められるが、こうした熱放出速度の決定には音響信号の fitting が必要であり、¹⁴ その過程で音波の減衰速度定数や音速、熱放出速度などパラメーターが多く、信頼性のある fitting は難しい。そのため音響波の1周期の10分の1の時間分解能を得ることは困難で、普通の実験条件ではTG法で50~30 ps が測定時間の限界とされていた。この欠点を補うため、音響ピークシフト法を考案した。これは音響成分を用いるが、curve fitting を行なうのではなく、音響信号のピークシフトを正確に測定する方法である。この音響信号のピークの時間は熱量の放出遅延時間と音速に依存するため、その時間と音速を同時に測定するという手法で、ピコ秒のオーダーで熱放出速度が決定される。¹⁴

4. 励起状態失活後の速い温度上昇

まず、温度レンズ信号を用いて捕らえた、光励起後の高速温度上昇測定の結果を紹介する。^{7,15} 30ピコ秒パルス幅を

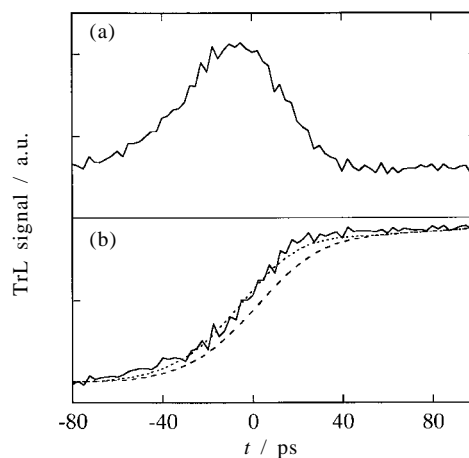


Fig.5 Time profiles of (a) optical Kerr lens component and (b) temperature lens signal obtained from the transient lens signals shown in Fig.4. Dotted line: calculated temperature rise profile with a very fast rate (< 2 ps). Broken line: calculated temperature rise profile with a lifetime of 10 ps.

持つNd:YAGレーザーの基本波で、ニッケル水溶液を光励起した後、プローブ光が広がる凹レンズの生成が観測された。この広がりの程度はポンプとプローブの遅延時間に依存し、その変化をピンホールを通した光強度の変化として記録したのがFig.4である。ポンプ光とプローブ光の偏光方向が平行の時 ($E_{\text{pump}} // E_{\text{probe}}$; $I_{//}$ 信号) も、垂直の時 ($E_{\text{pump}} \perp E_{\text{probe}}$; I_{\perp} 信号) も、始めに凸レンズが生成して、その後凹レンズに変化していることが分かる。この始めの凸レンズの強度は、 $I_{//}$ 信号の方が I_{\perp} 信号よりも強い。このポンプ光とプローブ光が重なっているときの凸レンズ信号は、光カー効果によるレンズ効果であることが分かった。この光カー効果のレンズ信号の偏光依存性より光カー効果と温度レンズの寄与に分離した (Fig.5) この信号を、装置応答関数でたたき込みをとった単一指数関数 (Fig.5点線) で fitting を行なったところ、その立ち上がりは2~3ピコ秒以内であることが明らかとなった。すなわちニッケルイオンを光励起後、2~3ピコ秒以内に温度は既に立ち上がっていることを示している。水の熱拡散定数 (D_{th}) から計算すると、ニッケルイオンから放出された熱は、2~3ピコ秒では、イオンの周囲の水の第1~2層までしか広がっていないことがわかる。即ち、ニッケルイオンに配位した水、あるいはそれを取り巻く1層の水分子が「熱く」なった状態を、この温度レンズ信号で観測していることがわかった。

更に、分子間相互作用とこのエネルギー移動過程の関係を調べるため、溶媒を変えて発熱速度を測定した。このために、音響グレーティングのピークシフト法を betaine-30

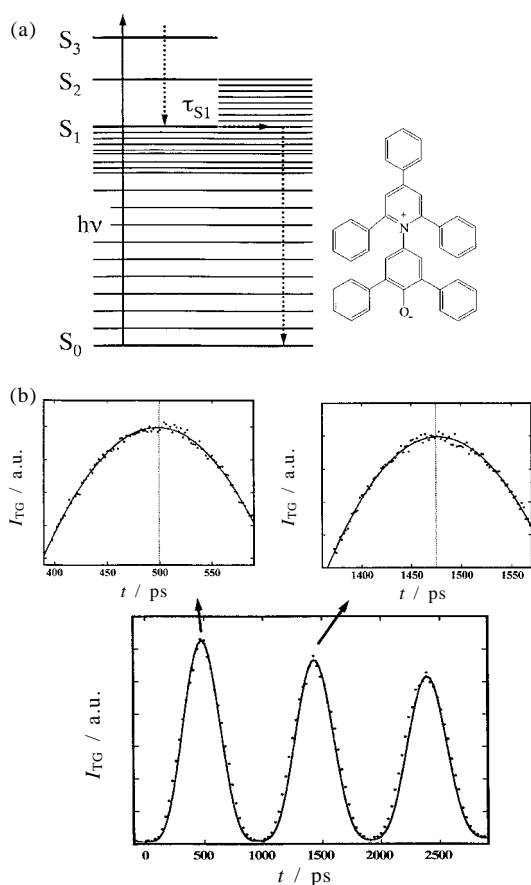


Fig.6 (a) Molecular structure of Betaine-30 and the energy diagram. The radiationless transition occurs without changing the energy and then the energy relaxation (cooling) takes place. (b) Observed acoustic grating signal after photoexcitation of Betaine-30. The peak delay time was calculated within an accuracy of 2 ps by measuring the peak arrival time accurately.

という分子 (Fig.6) に適用した。¹⁶⁾ この分子を第3励起 (S_3) 状態へ光励起した後の音響信号のピークの位置より、ピーク遅延時間 (τ_{pd}) が求められる (Fig.6)。これは、 S_3 (S_2) S_1 S_0 の緩和によるエネルギー放出を反映している。ここで S_3 S_1 の過程は十分に速いことが分かっているが、 S_1 状態の寿命 (2 ~ 10 ps) は、観測されたピーク遅延時間と比べて無視できない。この熱化による遅延とは無関係の S_1 状態の寿命を補正した値が、純粋に熱放出速度 (τ_{temp}) となる。各溶媒中での値を用いてピークシフト値を τ_{temp} に変換した。この値は、エタノール中で約 8 ps であり、このことは、水中の Ni イオンの場合とは異なり、励起状態が失活してからすぐに熱になるのではなく、エネルギー平

均してこれぐらいの時間が必要であることを示す。

この熱放出寿命 (τ_{temp}) は、溶媒のどのような性質に依存しているのだろうか。今回得られた τ_{temp} の溶媒依存性を検討するため、溶媒の熱拡散定数 (D_{th}) や、ヒドロキシ基の単位体積あたりの数 (N_{OH}) に対してプロットしてみた。溶媒の熱拡散定数に対してはほとんど相関が見られないが、 N_{OH} に対しては驚くほどきれいな直線関係が得られた。また、溶媒の経験的に見積もられた水素結合能に対してプロットしたときも、相関が見られた。このことは、溶媒の持つ水素結合が熱化過程に重要であることを示しているものと考えられる。この水素結合の影響としては、溶質からエネルギーを速く運び去る効果と、溶媒内で速く熱を広げてしまう効果が考えられる。もし溶媒 - 溶媒間の水素結合で熱が広げられるために速く熱化しているとするならば、熱拡散定数との間に相関が見られるはずであるが、実際には見られていない。このことより、溶質 - 溶媒間の水素結合によるエネルギー運び出し効果が重要と考えられる。この水素結合による熱化速度の増加は、先に述べた水溶液中での速い熱化速度と矛盾しない。

興味深いことは、励起直後に見られるポピュレーショングレーティング (PG) 成分 (これは励起状態生成などによる吸収スペクトル変化によって現れる成分である) に、20 ps のダイナミクスが観測されていることである。これは基底状態での振動冷却過程と同定された。この成分が観測されたということは、溶質分子が 20 ps で冷却される成分は存在するということである。それにも関わらず、 τ_{temp} の値はもっと速い熱化過程を示している。この一見矛盾する観測は、熱化過程に複数の経路があることを示していると解釈された。例えば速い熱化過程の速度を 1 ps とすると、この速い速度と 20 ps の速度で放出される熱エネルギーの比は約 2:1 となる。

この現象を説明するため、以下のようなモデル計算を行った。¹⁷⁾ 光を吸収する溶質は半径 R の球と考える。この溶質が無輻射遷移でエネルギーを放出し、「熱い」状態になる。このエネルギーを、そばにあるいくつかの分子 (directly energy accepting (DEA) 分子) が受け取る (Fig.7)。この速度は、二つの分子間相互作用とその温度差に比例するとした。熱はこの DEA 分子に受け取られた後、周囲に数多く存在するバルクの溶媒へと移っていく。このバルクの溶媒は連続体として、熱の伝達は熱拡散を仮定した。このモデルで、溶質分子と溶媒分子の温度を計算すると、この温度変化は、見かけ上二つの指数関数の和で表わされ、先に見た速い熱放出と遅い熱放出を再現することができる (Fig.7) 即ち、熱い溶媒から水素結合等の分子間相互作用を通じて受け渡された熱は、周囲の 2 ~ 3 個の溶媒を暖めるとだんだん飽和してしまい、後は溶媒の熱拡散で冷えていくにした

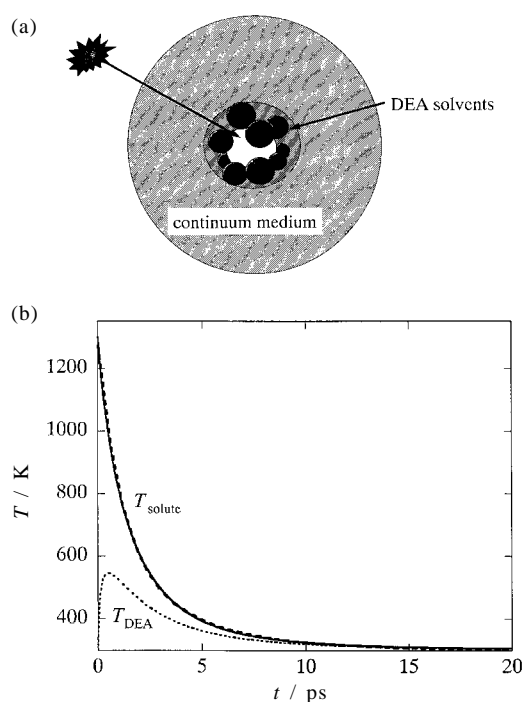


Fig.7 (a) Heat releasing model from the photo-excited molecule and (b) the calculated temperature change for photo-excited solute (solid line) and the DEA molecule (dotted line). The broken line on the solid line is the best fitted curve with a bi-exponential function.

がってゆっくりと放出されるという描像が考えられる。この時、DEA分子としては、第1溶媒和圏の全ての分子ではなく、2~3個の分子がエネルギーを受け取っていると考えなければ実験結果を説明することはできない。このことは、先の水素結合した分子が効率良くエネルギーを受け取るという描像と一致する。

5. 時間分解分子体積変化・エンタルピー変化

以上のように、速い時間スケールで熱エネルギーを屈折率変化として測定できることが示された。化学反応に伴って放出される熱エネルギー (Q) は、温度上昇による屈折率変化 (δn_{th}) と

$$\delta n_{th} = (dn/dT)QW\Delta N/\rho C_p$$

(W : 分子量, ρ : 密度, C_p : 定圧熱容量, ΔN : 光励起溶質分子数) の関係にある。この関係式を用いると、測定したい試料の信号強度を、標準試料 (通常は吸収した光子エネルギーを全て熱エネルギーに変換する分子を用いる) からの信号強度と比較することで、 Q を求めることができる。

よって、この手法を化学反応に適用すれば、放出される熱量を刻々と計測できることになる。 Q を、光子エネルギーから差し引くことで、反応中間体生成の反応エンタルピー ΔH を時間分解で検出できることになる。また、化学反応に伴い分子体積が変化すれば、溶液の屈折率が変化する。溶質分子と溶媒分子の分子体積を V_i と $V_{solvent}$ 、溶質と溶媒分子の分極率を α_i と $\alpha_{solvent}$ 、とした時、Lorenz-Lorentz 関係式を用いると、化学種 i による屈折率変化 (δn_{spe}^i) は、

$$\delta n_{spe}^i = \frac{(n_0^2 + 2)^2}{6n_0} \frac{1}{3\epsilon_0} \Delta N \left(\alpha_i - \frac{\tilde{V}_i}{\tilde{V}_{solvent}} \alpha_{solvent} \right)$$

(n_0 : 屈折率, ϵ_0 : 誘電率, ΔN : 溶質分子数) によって与えられる。¹⁸⁾ よって、TG あるいは TrL 信号の定量測定より δn_{spe}^i を測定することで、溶質の分子体積が求められる。この信号は熱と同様に非常に速い時間分解が可能であるため、分子体積も時間分解測定可能となる。こうした分子体積 (部分分子容) は、周囲との相互作用も反映する分子情報を豊富に含む量であるため、本手法は化学反応に対して、これまでの速度論的研究とは異なった全く新しいデータを与えてくれる。

こうした測定法は、初期には、diphenylcyclopropanone の光解裂反応やアゾベンゼンの光異性化反応など比較的単純な溶液中光化学反応の ΔV や ΔH 測定として応用された。^{18,19)} これは、全く仮定なしに一定温度、一定圧力下で測定された ΔH や ΔV の初めての例である。ここでは、最近のたんぱく質ダイナミクス解明への応用例として、蝸のロドプシン反応に適用した結果を簡単に示す。²⁰⁾ ロドプシンは、目の視細胞の中にあり、光を受けて電気信号に変換する初期の光受容蛋白である。比較的大きな蛋白質部分 (opsin) と光を吸収するための発色団 (11-*cis*-retinal) からなる。この発色団が光励起されることで、種々の中間体を経て最終生成物になる過程は、過渡吸収法などで詳細に調べられてきた。その結果、蝸ロドプシンの光励起により Prinehodopsin (プライム), Bathohodopsin (バソ), lumirhodopsin (ルミ), Mesohodopsin (メソ), と名づけられた中間体を経て Acid Metahodopsin (アシドメタ) と呼ばれる最終状態に変化する反応スキームが明らかになった。最後のメソからアシドメタにいたる速度は 15 で 18 μs であり、この時間で反応は完結する。しかし、注意しなければならないのは、これらの反応スキームの研究は、ほとんどが発色団であるレチナールの吸収変化をモニターして調べられていることである。ところが、発色団の吸収はその周り数 Å の距離にある部分の変化しか検出できない。ロドプシンの大きさは 6.4 nm \times 2.8 nm \times 3.9 nm ぐらいであるので、発色団から遠い部分がほとんどである。これらの部分の変化はこのスキームに影響しないのであろうか。

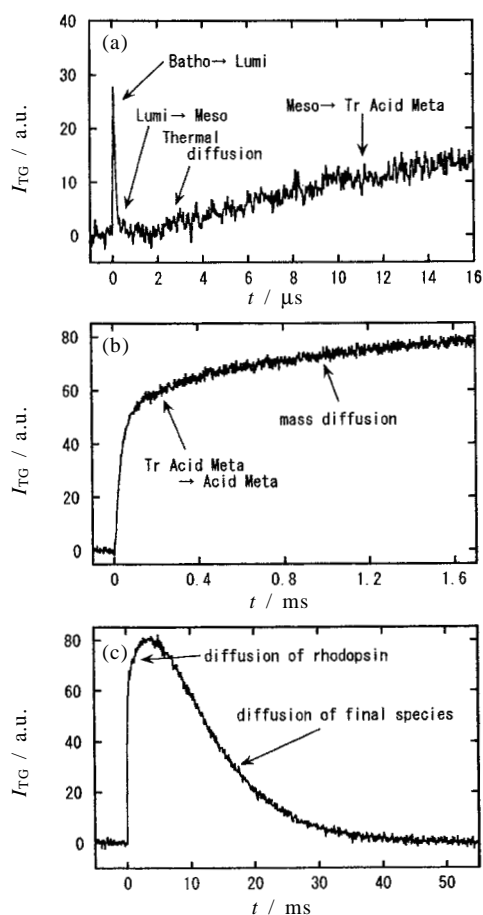


Fig.8 The TG signal after the photo-excitation of octopus rhodopsin in buffer solution on different time scales. Dynamics that represents the transformation of the rhodopsin are presented.

まず、従来考えられていた反応スキームを、TG法を用いてエネルギーや分子体積の観点で検討しなおした。²⁰⁾ ロドプシンを光励起した後のTG信号には、これまで過渡吸収で捉えられていた励起状態からアシドメタに至る過程が検出された (Fig.8) しかしそれだけでなく、過渡吸収による観測では変化が終わったあとの時間でまだまだ信号が変化しているのが観測された (Fig.8) これは発色団周囲の変化が終わったあともまだ離れた蛋白部分が変化していることが体積変化として検出されたことを示す。即ち、これまでアシドメタと呼ばれていた部分は実は一つの間体ではなく、まず発色団付近の変化が終わった後に段階的に別の部分が動いているのである。この新しい中間体をトランジエント (過渡) メタロドプシンと名づけた。これは、まさにエネルギーや分子体積という観点からダイナミクスを見

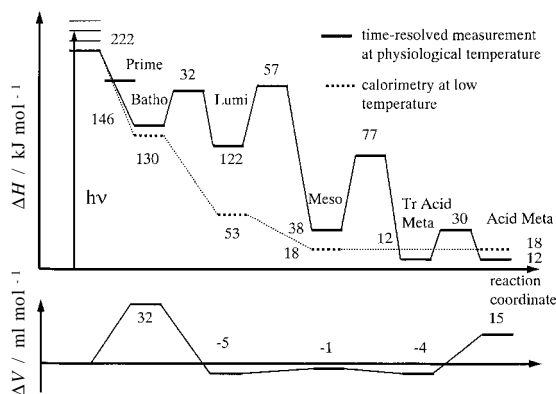


Fig.9 Enthalpy curve (upper) and the volume change curve (lower) during the photo-reaction of octopus rhodopsin. The enthalpy curve determined for cryogenically trapped intermediate species by the direct calorimetric measurement is shown by a broken line.

直すことで、これまで見えなかった新しい過程が観測される可能性があることを示す。別のデータと考え合わせることで、この過渡種が次のG蛋白との相互作用に必要な重要な中間体であることが示唆されている。

では、こうした中間体のエネルギーはどうなっているのだろうか。化学反応を議論するうえで、エネルギー曲面上のダイナミクスとして捉えられることが多いが、こうしたエネルギー曲面は理論的に描かれるものであり、実験的に描くのは不可能であった。蛋白質反応においても、しばしば実験的に求められたエンタルピー変化が議論されるが、これらは低温にすることにより中間体をトラップして熱力学測定で求められた値が主に用いられる。しかし、低温でトラップしているということは、溶媒まで含めた系の構造がそれ以上変化しないように固定化されているということであり、反応中の値とは異なっている可能性がある。我々は、蛸ロドプシンの反応について、TG法を用いて各中間体のエンタルピー変化と体積変化を、反応が起こる条件下で時間分解測定することに成功した。²¹⁾ この計測により求められたエンタルピー曲線と体積変化曲線を Fig.9 に示す。この図には、低温トラップ法で求められていた ΔH も同時に載せている。幾つかの中間体では驚くほど一致していたが、ルミ中間体ではかなり異なっている。即ち、低温での構造ではバソからルミになる過程でエネルギーが安定化しているが、室温での反応中での測定ではルミからメソになる過程でエネルギーの安定化が起こっていることがわかる。これは低温における構造と、反応中での構造でかなり異なっていることを示している。

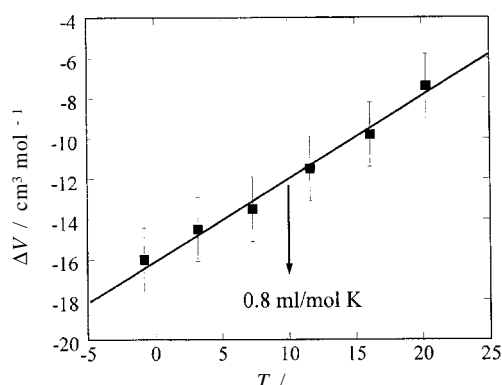


Fig.10 Temperature dependence of the volume change during the photo-reaction of PYP (Photoactive Yellow Protein) determined by the transient grating method.

6. 過渡分子の熱膨張係数変化

ここで紹介した手法で注目すべきは、 ΔV や ΔH がある一つの温度、压力下で一回の測定により決定できることである。これは従来の古典的手法である、平衡定数の温度依存性や圧力依存性から ΔH や ΔV を求める方法、あるいは光音響信号の温度依存性から求めるなどの方法と比べて、非常に大きい特徴である。例えば、圧力依存性より反応の ΔV を求める際には、しばしば100 ~ 1000気圧もの圧力がかけられる。ところが、蛋白質は圧力変性という現象が良く知られているように、圧力をかけることでその構造が異なったものになることが多い。即ち、反応とは別の構造変化もその圧力依存性に現れている可能性があるため、平衡定数の圧力依存性から単純に求められた ΔV は、興味ある反応の ΔV ではない可能性もある。同様なことが温度依存性から求められた ΔH についても言える。こうした意味でも、1気圧、一定温度下での測定で求められた ΔV や ΔH は、真にその反応を反映した量になっているはずである。

また、 ΔV や ΔH の温度変化あるいは圧力変化を測定することで、別の熱力学量が求められる。例えば、PYP (Photoactive Yellow Protein) と呼ばれる紅色細菌の光受容蛋白の光反応における中間体の ΔV を測定したところ、室温付近では -7 ml mol^{-1} だったが0 付近では -16 ml mol^{-1} にまで、その絶対値が増えることがわかった (Fig.10)。²²⁾ この顕著な温度依存性は、熱膨張係数 (α)

$$\alpha = (1/V) \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)$$

が、反応前の蛋白と中間体で大きく異なっていることを示している。低温で負の ΔV の絶対値が増えることは、中間体

蛋白の α が大きいことを意味しており、その差が約 $0.8 \text{ ml mol}^{-1} \text{ K}$ であることが求められた。PYP自体の熱膨張の絶対値は求められていないが、よく似た大きさのミオグロビンが約 $13 \text{ ml mol}^{-1} \text{ K}$ であることを考えれば、中間体になることによる変化のこの値はかなり大きいと考えられる。 α がエントロピーと体積の揺らぎと

$$\langle SV - \langle S \rangle \langle V \rangle \rangle = \alpha k_B T V$$

の関係にあることを考えると、この結果は反応中間体で蛋白構造が揺らぎやすい「柔らかい」構造になっているとして解釈される。このことは、蛋白質の構造変性との関係で考えると興味深い。すなわち、変性蛋白ではやはり構造的に揺らぎやすくなっており、 α が天然構造より大きくなっていることが知られている。よって、PYPの反応中間体は全体構造が緩んだ変性体に近い構造を持っていると考えられる。同様な体積変化の温度依存性は、ミオグロビンのリガンド解離反応についても観測されており、化学反応中間体の蛋白部分はかなり緩んだ揺らぎやすい構造になって、後続の反応が起こっているのであろうことを想像させる。

また蛋白質の変性によって熱容量が変化することが知られているが、反応中間体において、もし変性と同様の構造変化が起こることがあれば、それは熱容量の変化として現れるはずである。この熱容量の時間分解も、 ΔH の温度依存性を調べることで可能となる。

7. まとめ

光吸収された分子が、そのエネルギーを熱として溶媒へ放出する初期の過程を、実時間で捕らえるための幾つかの手法と、得られた結果を概説した。これらは全て、我々の開発してきた新しい手法であり、これらで検出できる「熱」の時間分解能は現在でも世界最高速である。この手法を用いることで、熱となるのは従来予想されていたより1桁ほど速いことが明らかとなってきた。溶質-溶媒相互作用と熱拡散モデルに基づいた、単純な熱放出のモデルを提案した。また同様な手法で、部分分子体積の時間分解測定も可能となることを示した。更に、 ΔV や ΔH の温度依存性を検討することで、熱膨張係数や熱容量の時間分解計測も可能となった。こうした熱力学量は、これまで物質の本質の解明に大きな威力を示してきたことを考えると、こうした量の時間分解計測により、多くの化学反応の機構の解明に非常に重要な寄与をするであろうことが理解できる。

文 献

- 1) *J.de Physiq IV*, C7, vol.4, Special Issue (1994); *Progress in natural science* 6, Science in China Press, Beijing (1996); *Analytical Sciences* 17, Special

解 説

- Issue (2001); 寺嶋正秀, レーザー研究 **24**[7],765 (1996).
- 2) M. Terazima, *Pure Appl.Chem.* in press.
 - 3) 寺嶋正秀, 第4版実験化学講座 **7**, 485, 丸善 (1991).
 - 4) 寺嶋正秀, 固体物理 **29**, 607 (1994).
 - 5) M. Terazima, Advances in multiphoton processes and spectroscopy, Eds., S. H. Lin, A. A. Villaeys, Y. Fujimura, vol.10, 1-96, World Scientific, Singapore (1996).
 - 6) M. Terazima, *Adv.Photochem.*, **24**, (1998).
 - 7) M. Terazima, *Israel J. Chem.* **38**, 143 (1998).
 - 8) 寺嶋正秀, 分光研究 **47**, 230-244 (1998); M. Terazima, *Opt. Lett.* **20**, 25 (1995).
 - 9) H. J. Eichler, P. Gunter, and D. W.Pohl, "Laser induced dynamic gratings", Springer-Verlag, Berlin (1986); R. J. D. Miller in "Time resolved spectroscopy", ed. by R. J. H. Clark and R. E. Hester, John-Wiley&Sons (1989).
 - 10) M. Terazima, *Chem.Phys.* **189**, 793 (1994).
 - 11) M. Terazima and N. Hirota, *J.Chem.Phys.* **100**, 2481 (1994).
 - 12) M. Terazima, *J. Chem. Phys.* **104**, 4988 (1996).
 - 13) T. Okazaki, N. Hirota, and M. Terazima, *J. Mol. Liq.* **90**, 243-249 (2001).
 - 14) M. Takezaki, N. Hirota, and M. Terazima, *J. Phys. Chem. A* **101**, 3443-3448 (1997); M. Takezaki, N. Hirota, and M. Terazima, *J. Phys. Chem.* **100**, 10015 (1996); M. Terazima, M. Takezaki, S. Yamaguchi, and N. Hirota, *J. Chem. Phys.* **109**, 603 (1998).
 - 15) M. Terazima, *J. Chem. Phys.* **105**, 6587 (1996).
 - 16) M. Terazima, *Chem.Phys.Lett.* **305**, 189-196 (1999).
 - 17) T. Okazaki, N. Hirota, and M. Terazima, *J. Chem. Phys.* **110**, 11399-11410 (1999).
 - 18) M. Terazima, T. Hara, and N. Hirota, *Chem. Phys. Lett.* **246**, 577-582 (1995); T. Hara, N. Hirota, and M. Terazima, *J. Phys. Chem.* **100**, 10194-10200 (1996).
 - 19) S. Yamaguchi, N. Hirota, and M. Terazima, *Chem. Phys. Lett.* **286**, 284-290 (1998).
 - 20) Y. Nishioku, M. Nakagawa, M. Tsuda, and M. Terazima, *Biophys. J.* **80**, 2922-2927 (2001).
 - 21) Y. Nishioku, M. Nakagawa, M. Tsuda, and M. Terazima, *Biophys.J.* in press.
 - 22) K. Takeshita, Y. Imamoto, M. Kataoka, F. Tokunaga, and M. Terazima, *Biochemistry* **41**, 3037-3048 (2002).



寺嶋正秀 Masahide Terazima
 京都大学大学院理学研究科化学, Graduate
 School of Science, Kyoto Univ., TEL.
 075-753-4026, FAX. 075-753-4000, e-
 mail: mterazima@kuchem.kyoto-u.ac.jp
 研究テーマ: 光分子科学, 蛋白質ダイナ
 ミクス
 趣味: 植物育成