

筑波大学大学院博士課程

数理物質科学研究科博士論文

博士（工学）

テラヘルツ時間領域分光法によるタンパク質の水和
に対する塩効果の研究

青木 克仁

電子・物理工学専攻

目次

第1章 序論	3
1.1 タンパク質と水和	3
1.1.1 水	3
1.1.2 塩の水和	4
1.1.3 タンパク質	6
1.1.4 タンパク質の水和	8
1.2 塩によるタンパク質の溶解度と安定性の変化	8
1.2.1 Hofmeister 系列	8
1.2.2 Hofmeister 系列の逆転	9
1.2.3 Hofmeister 系列の分子メカニズム	10
1.3 様々な実験手法による水和の先行研究	11
1.3.1 X線散乱・中性子散乱	11
1.3.2 NMR とカロリメトリー	11
1.3.3 誘電分光	12
1.3.4 テラヘルツ分光	13
1.3.5 偏光解消 fs-IR 分光	15
1.3.6 光 Kerr 効果	16
1.3.7 和周波発生分光	17
1.4 研究目的	18
第2章 実験方法	19
2.1 測定試料	19
2.1.1 試料水溶液の作成	19
2.1.2 塩によるリゾチームの沈殿	20

2.1.3	水溶液中のリゾチームの立体構造の評価	21
2.2	テラヘル時間領域分光装置	27
2.2.1	テラヘルツ波の発生原理	27
2.2.2	テラヘルツ波の検出原理	29
2.2.3	光学系	35
2.2.4	テラヘルツ時間領域分光法の原理	37
2.2.5	試料セル	42
2.2.6	試料水溶液の屈折率と吸収係数	43
2.2.7	装置の高精度化とスペクトルの測定例	46
第3章	実験結果	66
3.1	リゾチームの水和とその解析	66
3.2	硫酸アンモニウムがリゾチームの水和に与える影響	75
3.3	様々な塩がリゾチームの水和水に与える影響	80
第4章	考察	97
4.1	テラヘルツ分光で見たリゾチームの水和に対する塩の影響	97
4.2	水和水に対する陰イオンの影響と Collins の水和モデル	98
4.3	選択的相互作用を調べる実験との比較	102
4.4	和周波発生分光による結果との比較	105
4.5	タンパク質の安定性・溶解度と水和	108
第5章	結論	111
	謝辞	114
	引用文献	115

第1章 序論

1.1 タンパク質と水和

1.1.1 水

水は、他の物質に比べて、特異的な性質を持つ [1-3]。液体の水の密度は、4 °C で最大となる。水の沸点と融点は、 H_2S 、 H_2Se 、 H_2Te 、 HF 、 NH_3 、 CH_4 のような水と類似した物質の沸点や融点と比べてきわめて高い。静電場に対する水の誘電率は、室温でおよそ 80 であり、きわめて大きい。水は、無機塩、糖、アミノ酸、ポリマーなどの様々な物質を溶かすことができる。これらの水の特徴は、水分子の持つ分極と水素結合によるものである。水素と酸素の電気陰性度の違いにより、水分子を構成する酸素原子は 2δ だけわずかに負に帯電し、水素原子は、 δ だけ正に帯電している。(図 1.1) 水分子の分極 p の大きさは、1.85 debye [1] であり、これにより水は強い極性分子に分類される。

液体の水において、水分子は互いに相互作用しあっている。ある水分子の $+\delta$ だけ帯電した水素原子と別の水分子の -2δ だけ帯電した酸素原子との間には、静電的な引力がはたらく。これにより、2つの水分子の酸素原子は、水素原子を介して弱く結合していると見る事ができる。この

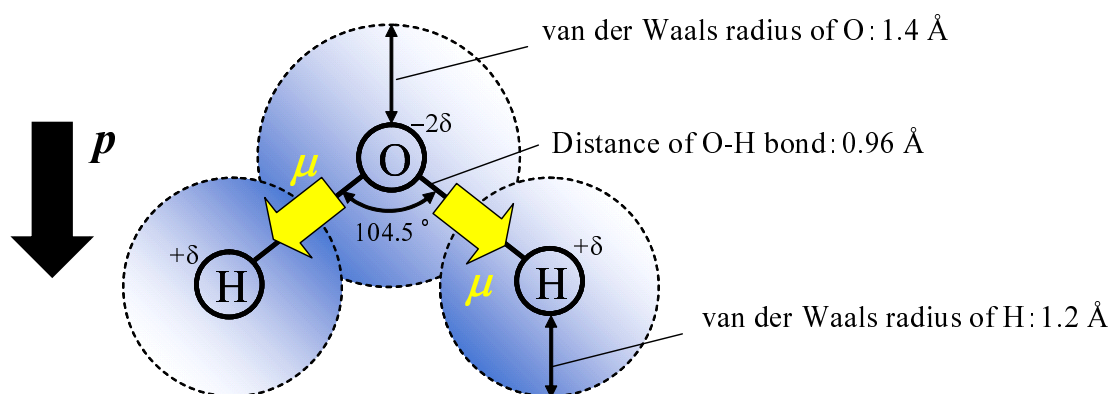


図 1.1. 水分子の構造と分子内の電荷分布 [1]

ような結合は水素結合と呼ばれる。水分子は、多数の隣接する水分子と水素結合をし合うことで、水素結合ネットワークを形成している。また、水分子は回転し、その回転の速さは水素結合の強さによって影響を受ける。水素結合は絶えず形成や破壊を繰り返しており、その時間スケールはピコ秒オーダーであることが知られている [4]。

分子内の分極と水素結合は、化学や生物学において、水を重要な物質としている。生物は水無しでは生きてゆけない。生体内の化学反応は水の存在下で起こる。生体内で起こる主な化学反応のひとつに加水分解がある。全ての酵素は機能を発揮するためには水が必要である。基質は酵素や抗体と水の中で結合する。水は、タンパク質の立体構造や機能発現において重要な役割を果たしている。タンパク質が固有の立体構造をとるためには、タンパク質とともに溶けている溶質、イオン強度、pH、温度などが適切である必要がある [5]。これは、溶液中のタンパク質が周囲の水と相互作用し、その相互作用が共に溶けている溶質によって影響を受けていることを示している。本論文では、タンパク質と水との相互作用が、塩によって影響を受けることについて論じる。

1.1.2 塩の水和

溶質が水の中に存在することを考える。バルク状態の水はランダムに配向しているが、水と溶質は互いに影響を及ぼしあい、水分子の配向や水素結合ネットワークに変化が生じる。このように溶質と水とが互いに影響を及ぼしあう現象は、水和と呼ばれる。簡単な水和の例として、単原子イオンの水和を考える (図 1.2(a))。イオンの水和の研究はふるくから行われている [2]。NaCl、KCl、NaF、NaBr などのような 1 価の陽イオンと陰イオンからなる塩は最も単純な構造を持つ塩である。最も単純なイオンの水和のモデルでは、イオンの電荷と水分子の双極子モーメント \mathbf{p} との間の静電的な相互作用を考えている [1]。イオンの電荷によってその周りに作られる電場の大きさ E は次のように書ける。

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e}{r^2} \quad (1.1)$$

ここで、 ϵ_0 は真空の誘電率、 r はイオンの中心からの距離、 e はイオンの電荷である。この電場内に置かれた水分子の双極子モーメント \mathbf{p} のもつポテンシャルエネルギー U は、次のように書ける。

$$U = -pE \cos \theta = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e}{r^2} p \cos \theta \quad (1.2)$$

ここで、 r はイオンと水分子間の距離、 θ は \mathbf{p} と \mathbf{r} との成す角である (図 1.2(b))。式 (1.1) と (1.2) から、イオン半径が小さいほど、水分子との距離 r が小さくなることができ、水分子の感じる電場は大きくなる。これにより、水分子の双極子モーメント \mathbf{p} は、イオンとその水分子を結ぶ直線に平行になろうとする。逆にイオンの半径が大きいほど、水分子の感じる電場は小さくなるので、双極子モーメントの向きに与える影響は小さい。すなわち、小さいイオンほど周囲の水分子に大きな力を与え、大きいイオンほど水分子に与える力は小さいといえる。

たとえば、 Li^+ 、 Na^+ 、 F^- のような小さなイオンでは小さな r をとりうるのに対して、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- のような大きなイオンでは r は大きくなる。イオンの価数が一定の場合、電場 E はイオン半径の減少に伴って大きくなり、イオン半径の増加と共に小さくなる。小さなイオンに隣り合う水分子は大きな電場 E によって強く束縛される。これは、「強い水和」と呼ばれることもある。また、イオンの周りの水分子は規則正しく整列する考えられることからイオンの周りの水が構造的になるといえる。このようなはたらきをするイオンは構造形成イオン (structure maker) とよばれる。一方、大きなイオンに隣り合う水分子は、静電的な束縛力が弱いので、バルク水に比べて動きやすい。これは、「弱い水和」と呼ばれることもある。イオンの周りの水分子の配列の規則性は弱まると考えられることから、構造的でなくなるといえる。このようなはたらきをするイオンは、構造破壊イオン (structure breaker) とよばれる。このモデルは、水溶液中のイオンの移動度がイオン半径に依存することを説明できる。大きなイオンの移動度は塩にほとんど依存しないのに対して、小さなイオンは移動度が小さい [2]。小さなイオンを取り囲む水は、粘度が大きいので、流体力学の Stokes の法則によれば移動度が小さくなる。

1957 年、二つの水和モデルが Samoilov [6] と Frank・Wen [7] によって提案された。Samoilov は、イオン近傍における水分子の並進運動を考え、近傍の水分子とその外側の水分子の交換が起こっていることを考えた。並進運動は、水分子の交換の活性化エネルギーの変化 ΔE によって特徴付けられた。彼は、 Li^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} や Ca^{2+} のような小さなイオンでは ΔE が正となり、 K^+ 、 Cs^+ 、 Cl^- 、 Br^- や I^- のような大きなイオンでは、負となることを報告した。 ΔE は水中での自己拡散とイオンの移動度の温度係数の実験データから次のように計算される。

$$\frac{\tau_i}{\tau} = \exp \frac{\Delta E}{RT} \quad (1.3)$$

ここで、 τ は水分子がある水分子の近傍に滞在する平均時間であり、 τ_i はイオンに対する最も近い平衡位置に滞在する平均時間である。Samoilov は、イオン近傍の水分子が動きやすくなる水和

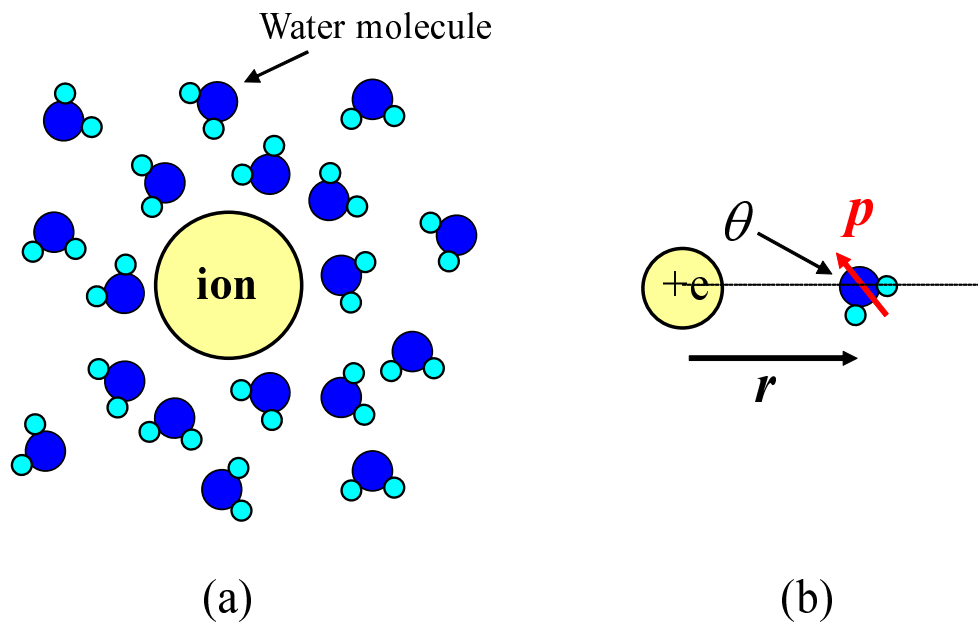


図 1.2. (a) イオンとそれを取り囲む水分子、(b) 水分子の双極子モーメント

($\Delta E < 0$) のことを「負の水和 (negative hydration)」と呼んだ。このモデルは水分子の交換の起こりやすさの視点から見た描像であるといえる。

Frank と Wen は、イオンの周囲には 3 種類の水が存在するというモデルを提案した。(図 1.3) 領域 A では、水分子はイオンと水の双極子モーメントとの静電的な相互作用によって束縛される。この領域では、水は動きにくく、静電力によって水の双極子モーメントを整列し、水の構造は強まる。領域 C では、水分子の状態はバルク水に等しい。領域 A と C にはさまれた領域 B では、水分子は領域 A やバルク水と比べてより動きやすい。この領域は、イオンの影響を強く受けて構造的になっている水とバルク水が競合しているために形成される領域で、水の構造は壊れている。彼らは、領域 A と領域 B のバランスによって、イオンが水の構造を形成するか破壊するかが決まると考えている。このモデルは、水の構造の視点で見た描像であるといえる。

1.1.3 タンパク質

タンパク質分子は、多数のアミノ酸で構成される分子である。アミノ酸の分子は、ひとつの分子にアミノ基 ($-\text{NH}_2$) とカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) の両方を有している。あるアミノ酸のアミノ基と別のアミノ酸のカルボキシル基がペプチド結合することによって、2つのアミノ酸は1つの分子

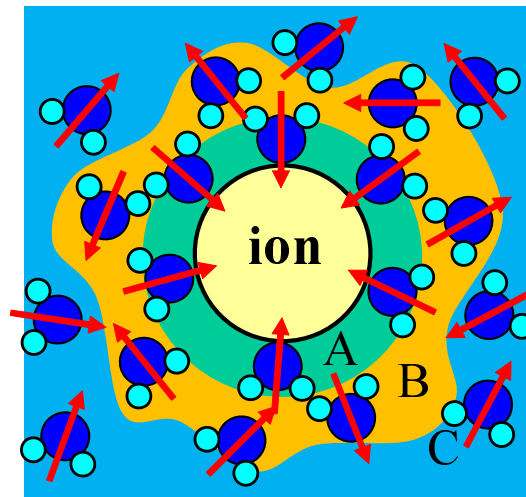


図 1.3. Frank-Wen の水和モデル

となる。タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合によってひも状に連なった分子からなる。分子内のアミノ酸の配列は、一次構造とよばれる。ひも状の分子は、局所的に周期的な構造をとることがある。このような構造は、二次構造とよばれ、 α ヘリックスや β シート構造が良く知られている。 α ヘリックスや β シート構造は、ペプチド結合の $>C=O$ と $H-N<$ との水素結合によって保持される。二次構造がさらに折りたたまれて形成される分子全体の立体構造は三次構造と呼ばれる。三次構造は、静電的相互作用、van der Waals 相互作用、疎水性相互作用などの弱い力により安定化している。

タンパク質の立体構造のとり方は無数にあると考えられるが、実際のタンパク質は生体内で特定の立体構造をとることで安定化している。この立体構造をとることで、タンパク質は固有の機能を発揮している。タンパク質は、尿素やグアニジンなどの変性剤や加熱によって不安定化し、変性する。変性により、多くのタンパク質は固有の機能を失うことが知られている。

アミノ酸の中には、側鎖にアミノ基を持つものとカルボキシル基を持つものがある。アミノ基は、水溶液のpHが小さくなると、水溶液中のプロトンと結合して正に帯電する。すなわち、 NH_3^+ となる。カルボキシル基は、水溶液のpHが大きくなると、 H^+ が解離して負に帯電する。すなわち、 COO^- となる。これにより、水溶液のpHによって側鎖の持つ電荷が異なる。タンパク質分子は、様々な種類の側鎖を持つアミノ酸からなるので、タンパク質の表面電荷はそれぞれのアミノ酸側鎖の持つ電荷の総和なる。タンパク質の表面電荷が0となる水溶液のpHを等電点(pI)とよぶ。水溶液のpHがタンパク質のpIよりも大きい場合、カルボキシル基からプロトンが解離し

て負に帯電する部分が増えるので、タンパク質の表面電荷は負となる。逆に、水溶液の pH がタンパク質の pI よりも小さい場合、アミノ基にプロトンが結合して正に帯電する部分が増えるので、タンパク質の表面電荷は正となる。

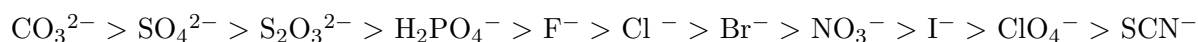
1.1.4 タンパク質の水和

アミノ酸は、側鎖の種類によって親水的なものと疎水的なものが存在する。タンパク質は様々な種類のアミノ酸からなる分子なので、アミノ酸の側鎖の種類によって親水的な部分と疎水的な部分がひとつの分子内に存在する。X線回折の結果によれば、多くの球状タンパク質は疎水的な部分を内側に、親水的な部分を外側にしてフォールディングしている [8]。これにより、分子の疎水的な部分を水と接触しないようにし、親水的な部分と水が接触するようにしている。温度変化や pH、塩などによって疎水的な部分が水と相互作用しやすい環境になると、タンパク質は構造を変化させ疎水的な部分が露出する。以上のことから、タンパク質と水との相互作用、すなわちタンパク質の水和がタンパク質の構造や安定性に寄与していると考えられる。

1.2 塩によるタンパク質の溶解度と安定性の変化

1.2.1 Hofmeister 系列

1888年、F.Hofmeisterは、卵白の水溶液に塩を加えると卵白が沈殿し、沈殿の起こる塩の濃度に規則性があることを報告した [9,10]。沈殿は、塩の添加によってタンパク質の溶解度が低下することにより生じる現象である。このような現象は塩析 (salting-out) とよばれる。また、塩の種類や濃度によっては、タンパク質の溶解度を増やすものもある。このような現象は塩溶 (salting-in) とよばれる。イオンをタンパク質の沈殿のさせやすさの順に並べたものは、Hofmeister 系列として知られている。特に、タンパク質の沈殿のしやすさは陰イオンの違いによって影響を受けることが知られている。Hofmeister 系列は、一般的に次のようなものである [11]。



この系列の左側に位置する CO_3^{2-} や SO_4^{2-} のようなイオンは、タンパク質を沈殿させる作用が強い。このようなイオンの特徴は、多価イオンであること、また、1価のイオンではイオン半径が小さいことである。逆に右側に位置する I^- 、 ClO_4^- や SCN^- のようなイオンは、タンパク質を沈

殿させる作用が弱く、タンパク質の溶解度を増加させる。このようなイオンの特徴は、1価の多原子イオン、すなわち、イオンの大きさが大きく電荷量が小さいことである。

塩は、溶解度だけでなく、タンパク質の安定性、水溶液の粘性、表面張力、バルク水の構造などに与える影響も Hofmeister 系列に従うことが知られている。バルク水に対する塩の影響についてみると、タンパク質を沈殿させやすいイオンほど水の構造を強める。このような構造形成イオンは、コスモトロープ (kosmotrope) ともよばれる。一方、沈殿させにくいイオンほど水の構造を破壊する。このような構造破壊イオンは、カオトロープ (chaotrope) ともよばれる。タンパク質の安定性は、コスモトロープによって安定化し、カオトロープによって不安定化する。水溶液の粘性は、コスモトロープによって大きくなり、カオトロープによって小さくなる。表面張力は、コスモトロープによって大きくなり、カオトロープによって小さくなる。

1.2.2 Hofmeister 系列の逆転

Hofmeister 系列は、タンパク質の単結晶を作成する条件を決める際の参考にされてきた。しかし、溶解度の変化のしかたが従来の Hofmeister 系列と逆になる例が経験的に知られている。ウシ血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin) 水溶液にチオシアン酸カリウムを加えると、水溶液の pH が BSA の等電点 pI よりも大きい場合 ($\text{pH} > \text{pI}$) には沈殿を生じないが、pH が pI よりも小さくなる ($\text{pH} < \text{pI}$) と沈殿する [12]。ここで、1.1.3 節で述べたように、 $\text{pH} > \text{pI}$ のとき、タンパク質の表面電荷は負であり、 $\text{pH} < \text{pI}$ のとき表面電荷は正である。ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL: hen egg white lysozyme) は、等電点の高いタンパク質 ($\text{pI} = 11.35$) として知られている。通常の溶液条件において、塩による HEWL の溶解度の変化は、逆 Hofmeister 系列に従う [13]。このことをまとめると、塩によるタンパク質の溶解度の変化は、タンパク質水溶液の pH がタンパク質の等電点 pI よりも大きい ($\text{pH} > \text{pI}$ 、表面電荷は負) ときに、順 Hofmeister 系列に従い、タンパク質水溶液の pH がタンパク質の pI よりも小さい ($\text{pH} < \text{pI}$ 、表面電荷は正) 場合、この順番は逆転し、逆 Hofmeister 系列に従う。

タンパク質の溶解度が順 Hofmeister 系列に従う条件において、コスモトロープはタンパク質の構造を安定化し、カオトロープは不安定化する。Bye らは、溶解度が逆 Hofmeister 系列に従う条件において、リゾチームの熱変性温度が、リン酸イオンや硫酸イオンによって上昇し、ヨウ化物イオンや過塩素酸イオンによって低下すると報告している [14]。すなわち、溶解度が逆 Hofmeister

系列に従う条件において、コスモトロープはタンパク質を安定化し、カオトロープはタンパク質を不安定化する。このことは、溶解度が順 Hofmeister 系列に従う場合の塩のはたらきと変わらない。このことから、タンパク質の安定性に対する Hofmeister 系列は、pH と pI の大小関係によらないといえる。以上より、pH と pI の大小関係の逆転によって、溶解度に対する Hofmeister 系列は逆転しても、安定性に対する Hofmeister 系列は逆転しないといえる。

1.2.3 Hofmeister 系列の分子メカニズム

タンパク質の沈殿を説明するための最も簡単な分子モデルは、静電遮蔽によるモデルである。塩を添加していない状態の水溶液中のタンパク質の表面は、正または負のどちらかに帯電している。この状態では、タンパク質分子は表面電荷による反発のため、分子同士は近づきにくく、溶解度は小さい。塩を添加すると、タンパク質の表面電荷と逆の電荷が近づき、表面電荷を遮蔽する。これによって、タンパク質分子間の反発力が弱まり、分子同士が近づきやすくなる。これは、溶解度が増加することを意味する。さらに塩を添加すると、表面電荷は塩による遮蔽の効果は強まり、タンパク質分子はさらに近づきやすくなり、沈殿が生じる。このモデルでは、塩濃度が薄いときに、硫酸アンモニウムのようなタンパク質を沈殿させやすい塩であってもタンパク質の溶解度を上昇させる現象を説明できる。しかし、このモデルでは、タンパク質の表面電荷の違いによって、溶解度に対する Hofmeister 系列が逆転することを説明できない。

近年、Flores らは、和周波発生 (SFG: sum frequency generation) 分光を用いて、モデル界面近傍における水分子の配向を調べ、得られた結果から界面近傍におけるイオンの分布を考察している [15]。その報告によれば、溶解度に対する Hofmeister 系列の逆転は、タンパク質の分子間の静電相互作用によって説明できる。このことは、4.4 節において詳しく述べる。一方、Flores らは、タンパク質の安定性に対する Hofmeister 系列が逆転しないことについては議論していない。1.1.4 節で述べたように、タンパク質の安定性にはタンパク質と水との相互作用、すなわち水和が重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、本研究では、タンパク質の安定性と水和の関係性について調べた。

1.3 様々な実験手法による水和の先行研究

1.3.1 X線散乱・中性子散乱

X線散乱や中性子散乱では、タンパク質の表面近傍にバルク水と密度の異なる水がどの程度あるかを調べることができる [16]。これらの手法により知ることができるのは、時間的に平均された水の情報である。X線の散乱は、原子内の電子密度分布の影響を受ける。水によるX線の散乱は、水分子中の酸素原子によるものであり、酸素原子の位置情報を得ることができる。中性子散乱では、水素原子などの軽い原子の位置を知ることができる。Svergunら [16]は、X線散乱と中性子散乱により、 H_2O および D_2O 中におけるリゾチーム、*Escherichia coli* 由来チオレドキシソリダクターゼ、*Escherichia coli* 由来リボヌクレオチドリダクターゼの三種類のタンパク質の水和を調べている。第一水和層の水の密度は、バルクの水の密度よりも平均で10%ほど大きいことを報告している。

1.3.2 NMRとカロリメトリー

NMR(nuclear magnetic resonance)では、 ^2H や ^{17}O の磁気緩和分散や、溶質と水との核 Overhauser 効果を観測している。磁気緩和は、磁場の急激な変化に対して磁気双極子の応答が遅れる現象である。タンパク質の水和層内の水はバルク水と入れ替わっているが、 ^2H や ^{17}O に対する縦緩和の分散曲線の形状から、タンパク質内部に水分子が滞在する時間とその数や、タンパク質表面における水分子の回転の相関時間を求めることができる [17,18]。核 Overhauser 効果は、2つの核スピン間の双極子相互作用が強いときに、一方の核スピンの共鳴を飽和させると、もう片方の核磁気共鳴スペクトルが増強する現象である。核 Overhauser 効果の強さは、核スピン間の距離の6乗に反比例し、4-5Å以下の距離にある原子核間で生じる [19]。核 Overhauser 効果の実験では、タンパク質の表面と水分子が直接相互作用している時間、すなわち第一水和層やタンパク質の分子内に水分子が滞在している時間を知ることができる [17,19]。これらの手法では、ナノ秒よりも遅い時間スケールの水分子の動きを知ることができる [4,17]。

Tompaらは、NMRとDSC(differential scanning calorimetry)を組み合わせることで、凍結したユビキチン水溶液中において凍らない水を調べている [20]。NMRにより水溶液中の水の量に対する凍っていない水の量の割合を知ることができる。DSCにより凍らない水の比熱を知ることができる。バッファーにユビキチンを溶かしたときと純水にユビキチンを溶かしたときでは、バッ

ファーに溶かしたときの方が凍らない水の割合が多いと報告されている。また、凍らない水の比熱は、バルク水の比熱よりも大きいと報告されている。DSC で明らかになるのは、水分子の動きの間接的な情報である。

1.3.3 誘電分光

誘電分光は、GHz よりも低い領域における物質の複素誘電率 $\tilde{\epsilon}(\omega)$ を調べる手法である。水は、20 GHz 付近に水分子の配向緩和による強い吸収ピークを持つことが知られている。液体の水に直流電場を印加すると、ランダムな方向を向いていた水分子の永久双極子モーメント \mathbf{p} が同じ向きにそろい、配向分極として観測される。交流電場を印加すると、kHz や MHz の振動数の電磁波の場合は電場の変化に \mathbf{p} の運動が追従できるが、GHz 帯では電場の変化に \mathbf{p} の運動が追従できなくなり、水は電磁波を吸収して熱を発する。GHz 帯の吸収は THz 帯にまで及んでいる。

GHz 帯から THz 帯における水による電磁波の吸収は、Debye 緩和、水分子の分子間振動、および水分子の稗動運動に由来するものであり、複素誘電率 $\tilde{\epsilon}(\omega)$ は次のように記述される [21]。

$$\tilde{\epsilon}(\omega) = \frac{\Delta\epsilon_1}{1 - i\omega\tau_1} + \frac{\Delta\epsilon_2}{1 - i\omega\tau_2} + \frac{A_S}{\omega_S^2 - \omega^2 - i\omega\gamma_S} + \frac{A_L}{\omega_L^2 - \omega^2 - i\omega\gamma_L} + \epsilon_\infty \quad (1.4)$$

ここで、第1項と第2項目はデバイ緩和を表す項であり、 $\Delta\epsilon_1$ と $\Delta\epsilon_2$ は、それぞれ緩和時間 τ_1 、 τ_2 によって決まる緩和の大きさである。第1項目は配向緩和によるものである。第2項目は水素結合ネットワークを形成していない孤立した水分子の衝突緩和によるものと考えられている。第3項目は分子間 (水素結合) の伸縮振動、第4項目は稗動運動を表す項であり、 A_S 、 A_L は振幅の大きさ、 γ_S 、 γ_L は減衰定数である。第5項目はきわめて高い振動数における誘電率である。第1項目の表す緩和モードの吸収ピークは 20 GHz にあり、第2項の吸収ピークは 1 THz、第3項の吸収ピークは 5 THz、第4項の吸収ピークは 15 THz に位置している。Yada ら [21] によって報告されたフィッティングパラメーターを用いて式 (1.4) を計算すると図 1.4 のようになる。20 GHz の吸収ピークはほかの吸収ピークに比べて 40 倍程度大きい。

GHz 帯から THz 帯における水による電磁波の吸収は、次の式のように系に含まれる水分子の双極子の総和の揺らぎに対応することが知られている [22, 23]。

$$\alpha(\omega) \propto \mathcal{F}\{\langle P(0) \cdot P(\tau) \rangle\} \quad (1.5)$$

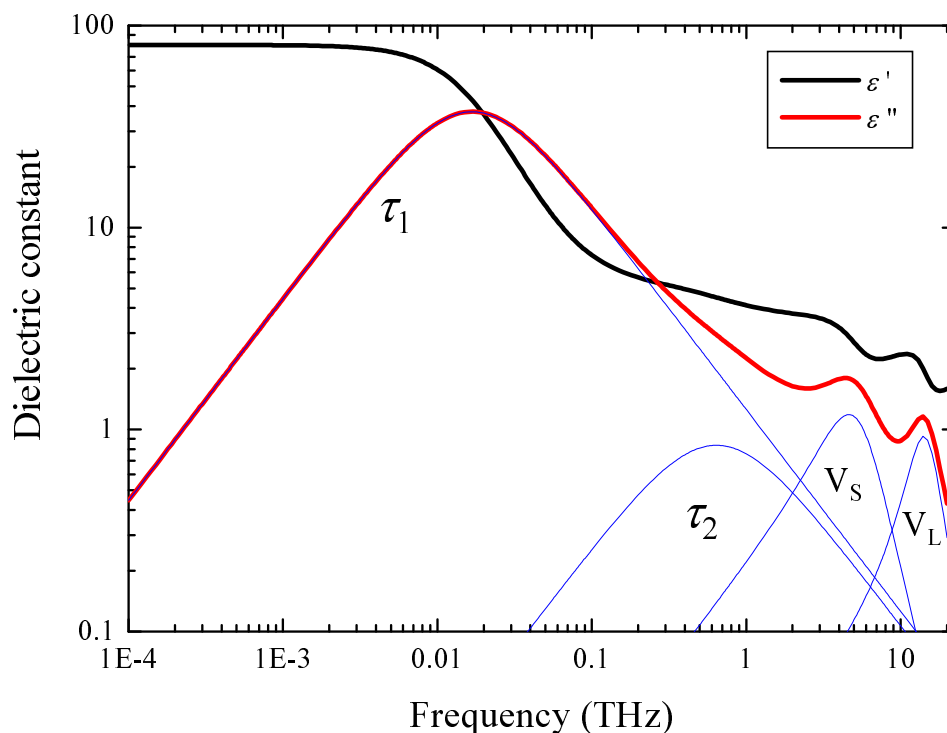


図 1.4. 293 K における水の誘電率。計算は式 (1.4) にパラメーター $\Delta\epsilon_1 = 74.9$, $\Delta\epsilon_2 = 1.67$, $\tau_1 = 9.47$ ps, $\tau_2 = 248$ fs, $A_S/(2\pi)^2 = 31.5$ THz², $\omega_S/(2\pi) = 5.30$ THz, $\gamma_S/(2\pi) = 5.35$ THz, $A_L/(2\pi)^2 = 108$ THz², $\omega_L/(2\pi) = 14.7$ THz, $\gamma_L/(2\pi) = 8.08$ THz, $\epsilon_\infty = 2.00$ を代入して行った。

ここで、 P は系に含まれる全ての双極子モーメント p の総和であり、 $\mathcal{F}\{\}$ は Fourier 変換を表す。誘電分光では、100 ps 程度の双極子のダイナミクスを明らかにすることができる [4]。

これまでに、誘電分光により、純水 [24–26]、塩水溶液 [27–35]、タンパク質水溶液 [36–41] などの誘電スペクトルが報告されている。

1.3.4 テラヘルツ分光

テラヘルツ分光は、試料の複素屈折率 \tilde{n} を測定する。 \tilde{n} から、試料の複素誘電率 $\tilde{\epsilon}$ を求めることができる。 \tilde{n} と $\tilde{\epsilon}$ の間には次の関係がある。

$$\tilde{\epsilon} = \tilde{n}^2 \quad (1.6)$$

テラヘルツ分光では、誘電分光と同様に水分子のダイナミクスの情報が得られる。誘電分光で明らかになるダイナミクスよりも速い、1 ps からサブピコ秒のダイナミクスを観測できる [4]。

テラヘルツ波は水に強く吸収されることから、普通の反射 [42–45] や内部全反射 [21, 46] 型の光学系を用いて水の分光が行われてきた。試料でテラヘルツ波を反射させる方法は、吸収が強い試料に対しては有効であるが、反射面がわずかにずれただけで誤差が生じる欠点がある。一方、テラヘルツ波を試料に透過させる方法は、最も単純な光学系であるが、吸収が強い試料の場合には試料の厚さを薄くする必要がある。テラヘルツ波を水に透過させて測定した報告には、高強度テラヘルツ光源として p-Ge を用いた報告 [47] や、高強度の Ti:Sapphire レーザーを用いた報告 [48] がある。これらの報告以前では、FT-IR を用いてテラヘルツ領域の測定を行った報告 [49] もある。

p-Ge や FT-IR を用いる方法では、テラヘルツ波の強度を調べることから、複素屈折率の虚部を知ることができる。テラヘルツ時間領域分光法 (THz-TDS: Terahertz Time-Domain Spectroscopy) は、試料を透過したテラヘルツ波の電場を時間領域で測定し、それをフーリエ変換することによって、その物質の屈折率の実部と虚部のスペクトルを得る方法である。THz-TDS を用いる利点として、Kramers-Kronig の関係式を用いることなく実部と虚部を同時に得ることができることがある。

タンパク質を対象とするテラヘルツ分光は、2000 年から始まったが、水の吸収が大きいことから、乾燥粉末状態の試料が測定されていた。Markelz らは、タンパク質の 1 つである BSA の乾燥粉末のテラヘルツスペクトルが報告した [50]。これ以降、テラヘルツ帯におけるタンパク質および生体分子のスペクトルが報告されている [51]。粉末状のタンパク質のテラヘルツ分光では、タンパク質のコンフォメーション、低周波領域における集団的固有振動、タンパク質の水和を調べることを主な目的としている。タンパク質のコンフォメーションや水和を調べる研究は、低周波領域における集団的固有振動モードがコンフォメーションの変化や水和によってどのように変化するかを調べており、タンパク質水溶液を乾燥させて薄膜にしたものや凍結した溶液や乾燥した粉末を試料としている [50, 52–58]。タンパク質のコンフォメーションが変化してもスペクトルに変化が見られないという結果が得られている [57, 58]。一方、タンパク質の水和に関しては、タンパク質の乾燥粉末が空気中の水蒸気と水和することでスペクトルに変化が生じるという結果が得られている [53, 55]。これらの報告は、すべて薄膜、乾燥粉末、あるいは凍結した溶液に対する実験であるが、実際にタンパク質が乾燥した粉末の状態で存在していることはほとんどない。空気中の水蒸気が乾燥粉末に結合して束縛されると、水溶液中でタンパク質分子の周囲の水が溶媒の影響も受けながら束縛されるのでは大きく条件が異なる。また、タンパク質水溶液が凍結し

た状態で存在しているということも多くはない。タンパク質は生物の体内にあり、液体の水とともに存在し、周囲に水が存在する状態で機能を発揮している。

タンパク質水溶液のテラヘルツ分光は、2005年から報告されている [59–64]。BSA とリゾチームの水溶液 [60,61,65]、ラムダリプレッサー水溶液 [62,63]、ユビキチン水溶液 [66]、不凍タンパク質水溶液 [67,68] のテラヘルツスペクトルが報告されている。いずれもタンパク質をバッファーに溶かしたものを試料としており、特徴的なピークの無いブロードなスペクトルが報告されている。Havenith らの研究グループは、水溶液中のラムダリプレッサーとユビキチンの水和を、テラヘルツ分光と MD シミュレーションを組み合わせるにより調べている [22,62,63,66]。彼らは、2.4 THz 付近の水溶液の吸収スペクトルを様々なタンパク質濃度で調べている。タンパク質濃度の小さい領域では吸収が増加するが、タンパク質濃度が大きい領域では吸収が減少すると報告している。MD シミュレーションにより、タンパク質と水との相互作用により水のダイナミクスが遅くなり、2.4 THz 付近で水の吸収が増加することを示している。(また、2 THz 以下では、水のダイナミクスが遅くなることで、水の吸収が減少することも示している。) 彼らは、タンパク質濃度の小さい領域で観測された吸収の増加は、水のダイナミクスが遅くなっていることにより生じると述べている。このことから、テラヘルツ帯における吸収の増減を調べることで、タンパク質の表面近傍の水分子のダイナミクスに関する情報を知ることができると考えられる。さらに彼らは、タンパク質濃度の大きい領域で観測される吸収の減少は、タンパク質の水和層が隣のタンパク質の水和層と重なり合うことによって、タンパク質の濃度増加に対して水和水の増加の仕方が緩やかになることで生じると述べている。水和層の重なり合いが生じるタンパク質濃度の解析から、タンパク質の水和は長距離に及んでおり、テラヘルツ分光では、第一水和層の外側の水和水も観測できると述べている。第一水和層の水分子 (タンパク質表面においてタンパク質と直接相互作用する水分子) は、NMR や X 線散乱、中性子散乱などにより観測できる [4,69,70]。タンパク質水溶液のほかに、糖 [4,69]、リン脂質 [70]、ポリマー [71]、塩 [72–82] などの水溶液が調べられている。

1.3.5 偏光解消 fs-IR 分光

偏光解消 fs-IR 分光では、水分子の OH 結合の配向のダイナミクスを知ることができる [83]。直線偏光の励起パルスを試料水溶液に入射すると、その光電場によって水分子は配向する。水分子

の配向が変化することで、OH伸縮振動の遷移双極子モーメント μ (図 1.1) の配向も変化し、OH結合による吸光度に異方性が生じる。励起パルスによって生じる試料の吸光度の異方性の時間変化をもうひとつの光パルス (プローブパルス) を用いて調べることで、回転異方性 $R(\tau)$ を評価できる。回転異方性 $R(\tau)$ は、次の式で示すように、励起された水分子の遷移双極子モーメントの2次の回転自己相関関数に比例する [83]。

$$R(\tau) \propto \langle P_2\{\mu(0) \cdot \mu(\tau)\} \rangle \quad (1.7)$$

ここで、 $P_2\{\}$ は2次の Legendre 多項式であり、 τ は励起パルスからみたプローブパルスの遅延時間である。この手法から、OH結合の配向のダイナミクスから水分子のダイナミクスを知ることができる。

Tielrooij らは、この手法とテラヘルツ分光を組み合わせることで、イオンの水和を調べている [74-77]。彼らは、偏光解消 fs-IR 分光とテラヘルツ分光とで、明らかになることの違いを次のように述べている。陰イオンに近づく水分子は、水素原子のほうが近づきやすく、イオンに対して水分子のどちらか一方の OH 結合の軸が固定される。水分子の電気双極子モーメント \mathbf{p} は固定されず、 μ を軸に回転できる。陰イオンと水分子の相互作用により動きやすさに大きな違いが出るのは、OH伸縮振動の遷移双極子モーメント μ の方である。したがって、陰イオンの水和は、テラヘルツ分光よりも偏光解消 fs-IR 分光により観測される。陽イオンに近づく水分子は、酸素原子のほうが近づきやすく、電気双極子モーメント \mathbf{p} が固定される。水分子の OH 結合と OH 伸縮振動の遷移モーメント μ は固定されず、 \mathbf{p} を軸に回転できる。陽イオンと水分子の相互作用により動きやすさに大きな違いが出るのは、電気双極子モーメント \mathbf{p} の方である。したがって、陽イオンの水和は、偏光解消 fs-IR 分光よりもテラヘルツ分光により観測される。以上のことから、テラヘルツ分光は偏光解消 fs-IR 分光と相補的な関係にある。

1.3.6 光 Kerr 効果

光 Kerr 効果は、3次の非線形光学効果の1つであり、光によって物質の屈折率に異方性が生じる現象である [84]。屈折率の変化は、光強度に比例する。水や二硫化炭素などの分子からなる液体では、屈折率の変化は、光電場によって分子が配向が変化することによって生じる。分子の配向はピコ秒の時間スケールで変化する。直線偏光の光パルスを液体試料に照射したときの試料の

屈折率の時間変化を測定することで、分子の配向のダイナミクスの情報を得ることができる。分子の配向運動は、ラマン振動モードと見ることができる [84]。光 Kerr 効果の信号を Fourier 変換することで、低波数の誘導ラマンスペクトルを得ることができる。ラマンスペクトルは分子の分極率の揺らぎの Fourier 変換 $\mathcal{F}\{\langle \alpha(0) \cdot \alpha(\tau) \rangle\}$ に対応する。光 Kerr 効果は、2つの意味で、テラヘルツ分光と対照的な関係にあると考えられる。ひとつは、光 Kerr 効果が試料の屈折率の変化を見ているのに対して、テラヘルツ分光では試料による電磁波の吸収を見ていることである。もうひとつは、光 Kerr 効果の実験で得られるラマンスペクトルが分極率の揺らぎに対応するのに対して、テラヘルツ分光で得られる吸収スペクトルは双極子モーメントの揺らぎに対応することである。ラマンスペクトルと吸収スペクトルは相補的な関係にあることから、この2つの手法も相補的であるといえる。

Mazur らは、タンパク質水溶液における水素結合の構造とダイナミクスを光 Kerr 効果により調べている [85]。その結果、タンパク質の第一水和層内の水のダイナミクスは、バルク状態の水と比べて8倍遅くなっていると報告している。

1.3.7 和周波発生分光

和周波発生 (SFG) 分光では、界面の水分子の配向を観測できる [15,86]。和周波発生は、2次の非線形系光学現象であり、反転対称性のある系では起こらない [84]。バルク状態の水では、水分子の配向はランダムのため反転対称性は無いが、界面近傍では界面と水分子との相互作用により配向がランダムではなくなることがある。そのため、界面近傍では反転対称性が崩れることがあり、SFG を起こすことができる。水分子の配向は、界面近傍の電場により生じる。Flores らは、帯電したモデル界面における水分子の配向の強さが陰イオンによってどのように変わるかを調べている [15]。彼らは、塩の添加による SFG 光のスペクトルの強度変化を見ており、彼らの議論している水分子の配向は時間平均された情報であるといえる。彼らの報告によれば、タンパク質の溶解度に対する Hofmeister 系列が pH と pI の大小関係で逆転することは、静電相互作用によって説明できる。Nihonyanagi らは、水分子の配向の強さを符号も含めて調べており、水の配向が陰イオンや陽イオンによってどのように変わるかを調べている [86]。SFG 分光とテラヘルツ分光との比較は 4.4 節において行う。

1.4 研究目的

タンパク質水溶液に塩を添加すると、タンパク質の溶解度は変化する。塩による溶解度の変化は、 $\text{pH} > \text{pI}$ (表面電荷が負)のときは順 Hofmeister 系列に従い、 $\text{pH} < \text{pI}$ (表面電荷が正)のときには逆 Hofmeister 系列に従う。すなわち、 pH と pI の大小関係によって、Hofmeister 系列は逆転する。Flores らの報告によれば、この Hofmeister 系列の逆転は、タンパク質分子間の静電相互作用によって説明できる [15]。一方、タンパク質の安定性の変化も塩によって異なることが知られている。タンパク質の安定性は、 pH と pI の大小関係によらず、順 Hofmeister 系列に従う。すなわち、 pH と pI の大小関係によって、Hofmeister 系列は逆転しない。安定性に対する Hofmeister 系列が逆転しないことについて、Flores らは議論していない。タンパク質の安定性には、水和が関わっていると考えられる。そこで、本研究では、ピコ秒の時間スケールで水分子の双極子モーメントのダイナミクスを直接的に観測できることを特徴とするテラヘルツ時間領域分光法を用い、 $\text{pH} < \text{pI}$ (表面電荷が正)の条件の下で、塩がタンパク質の水和にどのような影響を与えるかを調べた。また、水溶液のテラヘルツ分光により水溶液中の水和した水を観測する場合、高い測定の精度が要求されることから、テラヘルツ分光装置の高精度化を行った。得られた結果とこれまでの Hofmeister 系列に関する報告から、タンパク質の溶解度と安定性に対する Hofmeister 系列の分子メカニズムについて考察する。

第2章 実験方法

2.1 測定試料

2.1.1 試料水溶液の作成

塩がタンパク質の水和に与える影響を調べるために、塩水溶液とタンパク質-塩混合水溶液のテラヘルツ帯における吸収係数 α と屈折率 n のスペクトルを様々な塩濃度で測定した。本研究で用いたタンパク質は、ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL: hen egg white lysozyme, Sigma-Aldrich, L6876) であり、購入したものを精製せずに用いた。塩は、硫酸アンモニウム ((NH₄)₂SO₄, Wako, 019-03435)、リン酸二水素アンモニウム (NH₄H₂PO₄, Wako, 012-03305)、塩化アンモニウム (NH₄Cl, Wako, 017-02995)、硝酸アンモニウム (NH₄NO₃, Wako, 015-03231)、チオシアン酸アンモニウム (NH₄SCN, Wako, 015-03535) を精製せずに用いた。HEWL の正式名称は N-アセチルムラミドグリカノヒドロラーゼ (EC 3.2.1.17) であり、グラム陽性菌の細胞壁を構成するアミノ酸を含む多糖分子を基質として特異的に分解し、またある種のグラム陰性菌 (大腸菌、サルモネラ菌) の細胞壁をも分解する酵素である。分子構造が早くから明らかにされていたタンパク質のひとつであり [87]、分子量 14307 Da、129 個のアミノ酸残基からなるポリペプチド鎖 1 本からなる。HEWL の特徴として、(1) 鶏卵の自身から大量に得られる、比較的安価なタンパク質であり、(2) 1 つの分子に 4 つのジスルフィド (-S-S-) 結合を有しており、安定なタンパク質である。そのため、タンパク質を扱う実験には良く用いられ、性質が良く知られたタンパク質のひとつである。(NH₄)₂SO₄ は、タンパク質を変性させずに沈殿させることから、タンパク質の精製において重要な塩である。そのほかの塩は、陰イオンの違いによる HEWL の水和に与える影響の違いを調べるために、陰イオンのみが異なる。アンモニウムイオン (NH₄⁺) は、水の水素結合ネットワークの正四面体構造に構造が似ていることから、単原子イオンで現れる Rattling 運動が吸収スペクトルに与える影響が小さいと期待できる。

HEWL の等電点 pI は 11.35 であり、酸性から弱アルカリ性の溶液条件で pH < pI となる。つま

り、特に水溶液の pH を調整しなくても、溶解度が逆 Hofmeister 系列に従う溶液条件を容易に作ることができる。タンパク質水溶液と各種塩水溶液は、それぞれ純水 (Milli-Q) に溶かした。通常、タンパク質水溶液の pH はバッファーなどを用いて調整される事が広く行われるが、本研究では、バッファーがタンパク質の水和に与える影響を排除するため、バッファーによる pH の調整を行わずに実験を行った。HEWL 水溶液の濃度は、HEWL 水溶液中の水和水の量が多いほど水和の影響が明瞭に現れると考えられるので、本研究では HEWL の最終濃度を 200 mg/mL (14 mmol/L) とした。HEWL-塩混合水溶液を作るために、はじめに、HEWL 濃度 267 mg/mL の HEWL ストック水溶液と最終塩濃度の 4/3 倍の塩濃度の塩ストック水溶液を作成した。HEWL ストック水溶液の濃度は、可視紫外分光光度計 (ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, Del, USA) により、波長 280 nm における水溶液の吸光度で校正した。280 nm には、チロシンの側差とトリプトファンの側差の吸収に由来するピークが現れる [8]。しかし、この分光光度計では、HEWL 濃度 20 mg/mL 以上の水溶液の濃度を測定できないことから、試料水溶液を 20 倍に希釈したものを 3 つ作成し、3 つの水溶液の濃度をそれぞれ 2 回ずつ測定した。得られた 6 つの濃度を 20 倍したものの平均を試料水溶液の濃度とした。HEWL 267 mg/mL 水溶液と様々な濃度の塩水溶液を体積比 3:1 で混合し、最終濃度 200 mg/mL の HEWL 水溶液を作成した。HEWL ストック水溶液と純水を混合して作成した HEWL 200 mg/mL 水溶液の pH は 4.0-4.1 の範囲にあった。作成した HEWL-塩混合水溶液の pH は、全て 4.0-4.4 の範囲内であった。従って、本研究で扱う水溶液において、 $\text{pH} < \text{pI}$ であり、塩による HEWL の沈殿のしやすさは逆 Hofmeister 系列に従う。

2.1.2 塩によるリゾチームの沈殿

試料水溶液中のタンパク質が塩の添加によって沈殿や結晶化すると、それによって生じる凝集体や結晶によってテラヘルツ波の散乱などが生じると考えられる。テラヘルツ波が散乱されると、テラヘルツ帯の吸収スペクトルに影響を与える。さらに、タンパク質が凝集体を形成することで、タンパク質と水との接触面積が小さくなるため、凝集体を形成する前後で水和水の量が異なると思われる。つまり、凝集体の形成による水和量の変化は、塩が直接的に水和水に与える影響だけでなく、水との接触面積の変化による間接的な水和量の変化も含むことになる。従って、本研究では、タンパク質が沈殿や結晶化していない条件で水溶液のテラヘルツ分光を行った。

温度 20 °C において、HEWL 水溶液に塩を添加したときに、HEWL が沈殿や結晶化しない事

表 2.1. HEWL 200 mg/mL 水溶液において沈殿や結晶化しないことを確認した最大の塩濃度 c_{\max} (20 °C)

塩	c_{\max} (mol/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.375
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.625
NH_4Cl	0.25
NH_4NO_3	0.15
NH_4SCN	0.06

が確認できた最大の塩濃度 c_{\max} を表 2.1 に示す。沈殿や結晶化しているかの判断は目視で行った。沈殿や結晶化のしやすさは、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ と $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ の順序が逆になっていることを除けば逆 Hofmeister 系列に従っていることが分かる。通常の沈殿の実験は、1 mg/mL や 10 mg/mL 程度の薄い濃度で行われる。沈殿や結晶化のしやすさが一部で順序が逆になっている理由は不明であるが、タンパク質が高濃度であることが原因のひとつである可能性がある。塩濃度を高くすると、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4NO_3 と NH_4SCN では沈殿を生じたのに対し、 NH_4Cl では結晶化が起こった。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ は 0.5 mol/L で溶液をセルに封入してから 3 時間後に沈殿を確認した。 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ は、0.625 mol/L で溶液作成から 3 日後にわずかに沈殿を確認した（テラヘルツ分光測定の間中は沈殿を生じなかった）。 NH_4NO_3 は、0.18 mol/L で溶液をセルに封入してから 1 時間程度で沈殿を確認した。 NH_4SCN は、0.06 mol/L で溶液作成の翌日に沈殿を確認した（テラヘルツ分光測定の間中は沈殿を生じなかった）。 NH_4Cl は、0.3125 mol/L で溶液をセルに封入してから 1 時間程度で結晶が生じていることを確認した。さらに濃度を上げ、 NH_4Cl 濃度 1 mol/L で沈殿を確認した。

2.1.3 水溶液中のリゾチームの立体構造の評価

HEWL-塩水溶液中で HEWL が変性すると、HEWL 自身のテラヘルツ帯のスペクトルに影響を与えられられる。そこで、本研究では、全反射減衰 (ATR: attenuated total reflection) 光学系を用いたフーリエ変換赤外 (FT-IR: Fourier transform infrared) 分光法により、HEWL のアミド I

バンド ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) の吸光度スペクトルを測定した。アミドIバンドのスペクトルは、タンパク質の二次構造によってピーク位置が異なることが知られている [88]。Dong らは、アミドIバンドのスペクトルのデコンボリューションによりピークの線幅を狭くする処理をしたスペクトルから、 α ヘリックス構造のピークは $1650-1660\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れ、 β シート構造のピークは $1620-1640\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れると報告している [88]。彼らは様々なタンパク質のアミドIバンドのスペクトルを報告している。ピークの線幅を狭くする処理をする前のスペクトルにおいても、 α ヘリックス構造を多く含むタンパク質では、ピーク位置が $1650-1660\text{ cm}^{-1}$ 付近であり、 β シート構造を多く含むタンパク質では $1620-1640\text{ cm}^{-1}$ 付近である。このことから、アミドIバンドのスペクトルのピーク位置を見ることで、タンパク質が α ヘリックス構造を多く含むか、 β シート構造を多く含むかを知ることができると考えられる。この情報は、円偏光二色性 (CD: circular dichroism) スペクトルの測定により明らかになる二次構造の情報に対応すると考えられる。得られたスペクトルの形状が塩の種類や濃度によらず変化しないかを調べることで、HEWL が塩によって変性しているかどうかを調べた。本研究では、市販の FT-IR 分光装置 (FT/IR-4200, Jasco, Japan) と専用の ZnSe の ATR プリズム (ATR PRO 450-S PKS-ZNSE, Jasco, Japan) を用いた。

一般的には、タンパク質の二次構造は、紫外領域の光吸収の円偏光二色性 (CD) を用いて評価する。本研究でも、CD スペクトルによる HEWL-塩水溶液の評価を試みた。紫外領域の CD スペクトルは、市販の装置 (J-720W, Jasco, Japan) を用いて測定した。しかし、HEWL 濃度 200 mg/mL の水溶液は紫外領域における吸光度が大きいため、CD スペクトルの測定が困難であった。実際に、純水および 1 mg/mL と 200 mg/mL HEWL 水溶液の吸光度を測定した結果を図 2.1 に示す。 1 mg/mL HEWL 水溶液は、 200 mg/mL 水溶液と同様に、20 倍に希釈して濃度校正した 1.34 mg/mL ストック溶液と純水を体積比 3:1 で混合して作成した。水溶液の吸光度の測定には、市販の可視紫外分光光度計 (V-630, Jasco, Japan) を用い、試料セルには市販の石英セルを用いた。純水の測定で用いた石英セルの厚さ d は 1 mm であり、HEWL 水溶液の測定では $d = 1\text{ mm}$ と 0.2 mm のセルを用いた。純水と空の石英セルの吸光度は、短波長側ほど大きく、 0.1 程度である。空の石英セルの吸光度が純水の吸光度よりも大きい理由として、セル界面での反射の影響が考えられる。 1 mg/mL HEWL 水溶液の吸光度は、 $d = 1\text{ mm}$ で 215 nm 以下、 $d = 0.2\text{ mm}$ で 195 nm 以下で吸光度が 7 以上であった。どちらの厚さでも、 280 nm 付近には、チロシンの側鎖とトリプトファンの側鎖による吸収ピークが見られる。 200 mg/mL HEWL 水溶液の吸光度は、セルの厚さによらず、 300 nm 付近よりも短波長側で 7 以上であった。この強い吸収は、 1 mg/mL の水溶液

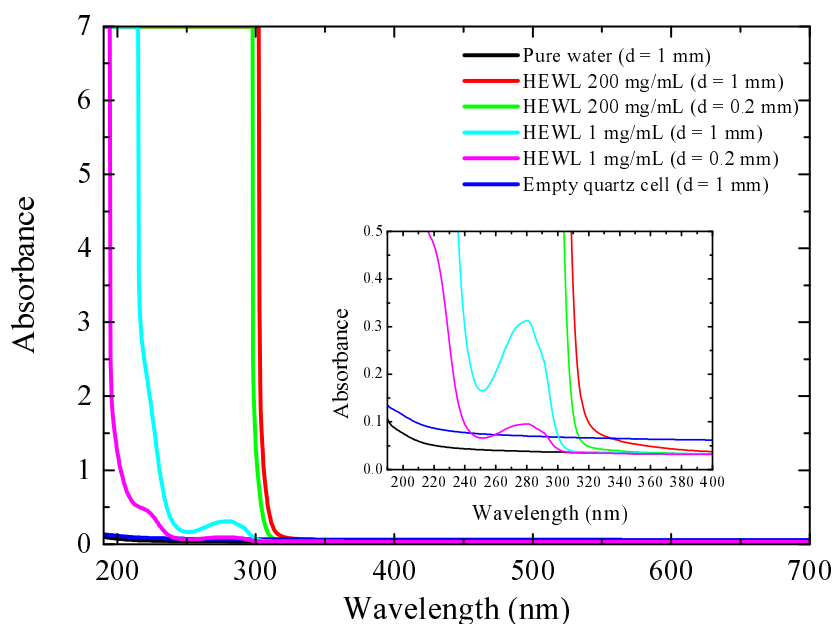


図 2.1. 可視紫外領域における純水および 1 mg/mL と 200 mg/mL HEWL 水溶液の吸光度スペクトル。挿入図は紫外領域における吸光度の拡大図である。

で観測できた 280 nm 付近の吸収ピークによるものである。一般的に、タンパク質の二次構造を評価するためには、190 から 230 nm 付近の CD スペクトルを測定する必要がある。このことから、CD スペクトルにより、HEWL の二次構造を評価するためには、HEWL 濃度を 1 mg/mL 程度、セルの厚さ 0.2 mm 程度にしなければならないといえる。さらに、CD スペクトルの測定を難しくする要因のひとつに紫外領域に強い吸収を持つイオンがある。SCN⁻ はその例である。図 2.2 に HEWL-NH₄SCN 混合水溶液と HEWL-(NH₄)₂SO₄ 混合水溶液の可視-紫外領域における吸光度スペクトルを示す。HEWL (1 mg/mL)-(NH₄)₂SO₄ (0.375 mol/L) 混合水溶液では、195 nm よりも短波長側で吸光度が 7 以上であった。一方、HEWL (1 mg/mL)-NH₄SCN (0.05 mol/L) 混合水溶液では、227 nm よりも短波長側で吸光度が 7 以上であった。図 2.3 に HEWL 1 mg/mL 水溶液、HEWL-NH₄SCN 混合水溶液と HEWL-(NH₄)₂SO₄ 混合水溶液の CD スペクトルを示す。HEWL 1 mg/mL 水溶液と HEWL-(NH₄)₂SO₄ 混合水溶液では、ノイズがのっているものの、207 nm 付近に負のピークを持つスペクトルが観測された。このピークは、タンパク質の α ヘリックス構造に由来するものである。(NH₄)₂SO₄ の存在の有無によらずスペクトル形状が変わらないので、HEWL

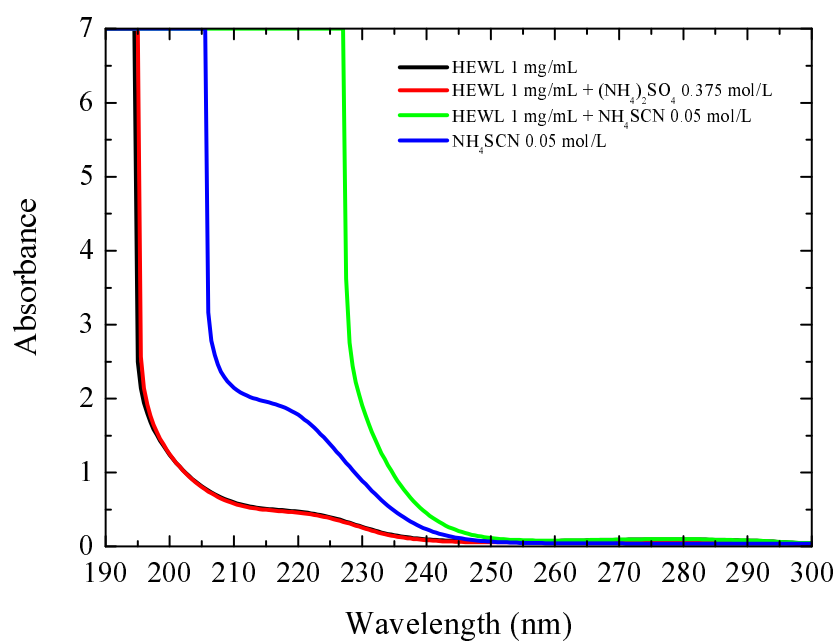


図 2.2. 紫外領域における 1 mg/mL HEWL-塩混合水溶液の吸光度スペクトル。セルの厚さは全て 0.2 mm である。

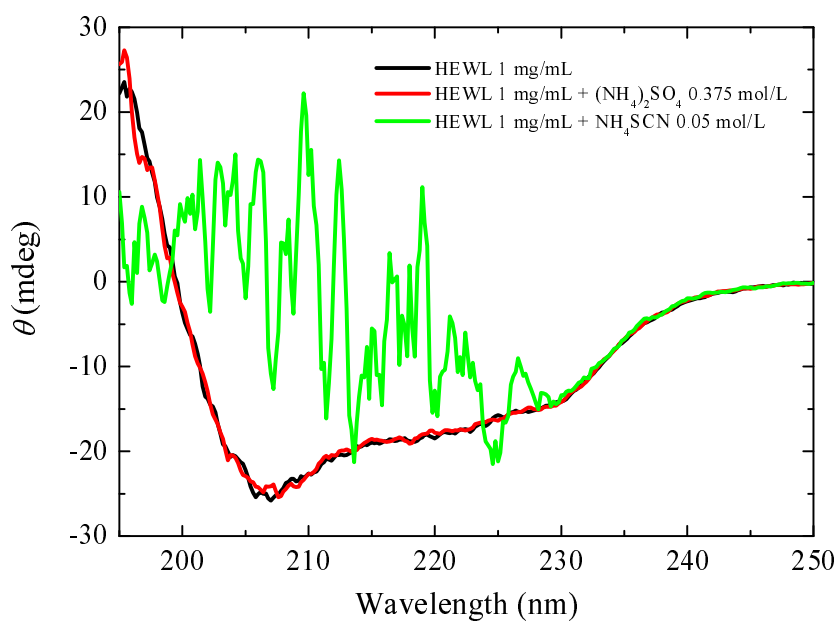


図 2.3. 紫外領域における 1 mg/mL HEWL-塩混合水溶液の CD スペクトル。セルの厚さは全て 0.2 mm である。

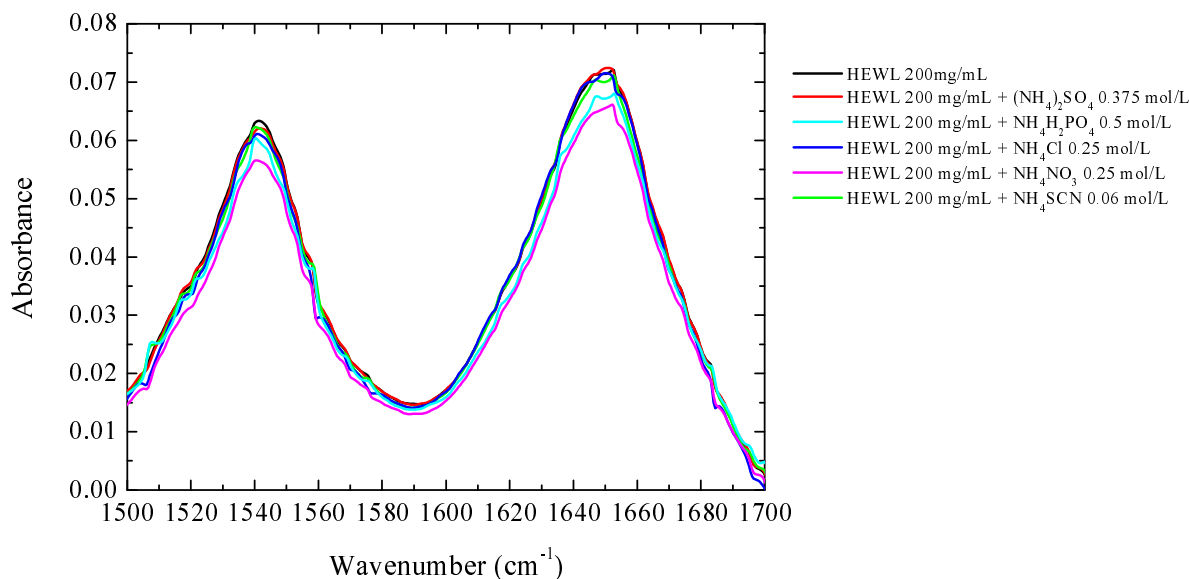


図 2.4. HEWL-塩水溶液中の HEWL のアミド I($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) およびアミド II バンド ($1500-1600\text{ cm}^{-1}$) の吸光度スペクトル

は α ヘリックスを多く含む (天然) 構造であり、HEWL 濃度 1 mg/mL において $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ による変性は起こらないといえる。一方、HEWL(1 mg/mL)- NH_4SCN (0.05 mol/L) 混合水溶液の CD スペクトルは、 230 nm より長波長側では塩を含まない HEWL 1 mg/mL 水溶液のスペクトルと一致しているが、 230 nm よりも短波長側では一致しない。図 2.2 を見ると、HEWL- $(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ 混合水溶液の吸光度は、 230 nm 付近で 2 程度である。吸光度 2 は、入射光のエネルギー透過率にすると 14% である。試料水溶液による光吸収が強く、透過光強度が十分でないために、CD スペクトルがノイズのようなスペクトルが観測されたと考えられる。HEWL 200 mg/mL 水溶液ではセルの厚さによらず、ノイズのようなスペクトルが観測された。このことから、CD スペクトルを測定するためには、本研究で用いた装置では、吸光度が 2 以下である必要がある。以上のように、CD スペクトルの測定では、本研究で用いる溶液の中に HEWL の濃度が薄い場合であっても測定できないものがあることから、FT-IR により HEWL の二次構造を評価した。

FT-IR スペクトルは、試料水溶液を ATR プリズム上に $10\text{ }\mu\text{L}$ を滴下して測定した。HEWL-塩水溶液の吸光度から塩水溶液の吸光度を単純に差し引いて HEWL の吸光度を算出した。得られた HEWL-塩水溶液中における HEWL の吸光度スペクトルを図 2.4 示す。塩の有無と塩の種類に

よらず、アミドIバンドの吸収ピークは 1650 cm^{-1} 付近に、アミドIIバンドの吸収ピークは 1550 cm^{-1} 付近に観測された。スペクトルに現れているノイズは、水蒸気によるものである。塩を添加していない HEWL 水溶液のスペクトルのアミドIバンドのピーク位置から、HEWL は α ヘリックス構造を多く持つ天然構造をとっているといえる。添加する塩によってスペクトルのピーク位置およびピークの形状は変化しないことから、本研究で扱う条件において、塩の種類によらず HEWL は天然構造を保っていると考えられる。

2.2 テラヘル時間領域分光装置

2.2.1 テラヘルツ波の発生原理

本実験では、Ti:Sapphire モード同期レーザー (仕様は 2.2.3 節を参照) を使用し、その光パルスを p 型 InAs 結晶の (111) 面に入射することで発生させた。結晶面に対するレーザーの入射角は 45° である。半導体である InAs 結晶の表面にパルス状のビームが入射すると、(1) 非線形分極、(2) フォトデンバー効果、(3) 半導体表面電場からの発生の 3 つの現象によってそれぞれテラヘルツ波が発生する。(1) 非線形分極によるテラヘルツ波の発生は、閃亜鉛構造をとる結晶である InAs に電場が印加されると 2 次の非線形分極が生じ、この分極が時間的に変化することによってテラヘルツ波が放出される現象である。この現象は、光パルスに含まれる 2 つのほぼ等しい周波数の光による差周波発生として説明することができ、一般的には光整流によるテラヘルツ波の発生とよばれる。(2) フォトデンバー効果は、結晶表面にバンドギャップよりも大きなエネルギーの光子が入射したときに、表面付近で電子正孔対が生成され、これが拡散する。ホールの拡散速度は電子の拡散速度よりも遅いため、図 2.5 に示すように両者の分布に違いが生じ、フォトデンバー電場が生じる。この電場の時間的な変化によりテラヘルツ波が放射される現象である。(3) 半導体表面電場からのテラヘルツ波の発生は次のようにして起こる。例えば n 型半導体の表面では図 2.6 に示すようにバンドが曲がっており、表面電場が生じている。p 型の場合も表面付近でバンドが下向きに曲がっているが、同様に表面電場が生じる。そこにフェムト秒レーザーが入射すると電子正孔対が生成され、表面電場によって加速されて電流が流れる。この電流によってテラヘルツ波が放射される。InAs の場合、半導体表面電場からのテラヘルツ波の放射は小さいと報告されている [89]。

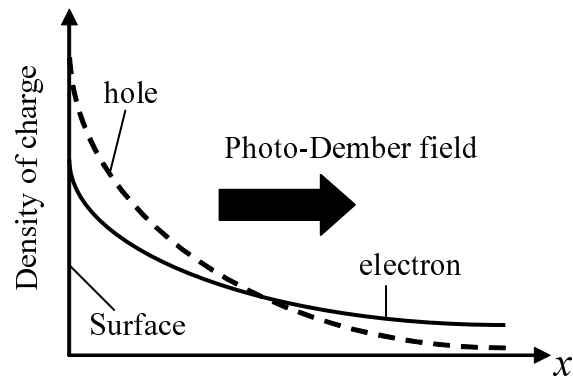


図 2.5. フォトデンバー効果における電子と正孔の分布

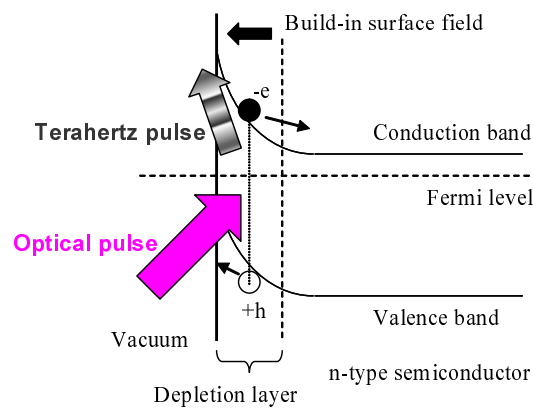


図 2.6. 表面電場からのテラヘルツ波の発生

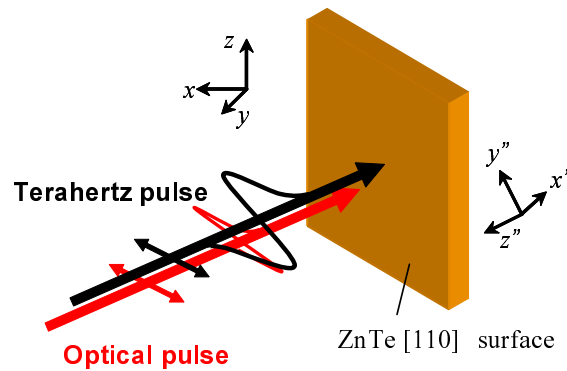


図 2.7. ZnTe 結晶へのテラヘルツ波と光パルスの入射

2.2.2 テラヘルツ波の検出原理

テラヘルツ波の電場を直接観測することは難しい。本研究では、電気光学 (EO: electro optic) サンプリング法を用いて間接的にテラヘルツ波の電場を検出した。EO サンプリング法は、EO 結晶にテラヘルツ波を照射し、このときに生じる結晶の複屈折性をレーザー光で検出する方法である。EO 結晶には ZnTe を使い、図 2.7 に示すように ZnTe 結晶の $(1\bar{1}0)$ 方向に振動するテラヘルツ波を入射した。また、レーザー光には、テラヘルツ波の発生するときと同様に、Ti:Sapphire モード同期レーザーの光パルスを用いた。光パルスの偏光は、テラヘルツ波と同様に $(1\bar{1}0)$ 方向である。テラヘルツ波が結晶に入射していないときは、光パルスの偏光によらず光に対する結晶の屈折率は一定であるが、テラヘルツ波が入射しているときには、光パルスの偏光によって光に対する屈折率に差異が生じる。この屈折率の差異を光パルスの偏光の変化として検出する。

ここで、テラヘルツ波の入射によって屈折率にどのような変化が生じるかを具体的に示す。テラヘルツ波の電場は、図 2.7 に示すように直交座標系 (x, y, z) をとると、

$$\mathbf{E} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} E_T \\ -E_T \\ 0 \end{bmatrix} \quad (2.1)$$

とかける。テラヘルツ波の電場は、光電場より振動が遅いので、直流電場とみなすことができる。ZnTe 結晶の屈折率は 2 階のテンソルであり、

$$\begin{bmatrix} \frac{1}{n^2} + \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_1 & \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_6 & \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_5 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_6 & \frac{1}{n^2} + \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_2 & \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_4 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_5 & \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_4 & \frac{1}{n^2} + \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_3 \end{bmatrix} \quad (2.2)$$

とかける。ここで、 n はテラヘルツ波が入射していないときの屈折率である。 $\Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_i$ は結晶にかかる電場の大きさによって決まる項であり [84]、

$$\begin{bmatrix} \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_1 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_2 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_3 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_4 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_5 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_6 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} \\ r_{41} & r_{42} & r_{43} \\ r_{51} & r_{52} & r_{53} \\ r_{61} & r_{62} & r_{63} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

と表されるものである。 $E_{x,y,z}$ は結晶にかかる電場の各成分である。 r_{ij} は電気光学係数である。ZnTe は結晶族 $\bar{4}3m$ に属する等方性結晶であるので、 $r_{41} = r_{52} = r_{63}$ であり、この3つ以外の成分はすべて0である [84]。式(2.1)で現される電場が ZnTe にかかっているとき、式(2.3)は

$$\begin{bmatrix} \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_1 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_2 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_3 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_4 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_5 \\ \Delta\left(\frac{1}{n^2}\right)_6 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ r_{41} & 0 & 0 \\ 0 & r_{41} & 0 \\ 0 & 0 & r_{41} \end{bmatrix} \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} E_T \\ -E_T \\ 0 \end{bmatrix} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ r_{41}E_T \\ -r_{41}E_T \\ 0 \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

となる。式(2.2)で表される屈折率テンソルは

$$\begin{bmatrix} \frac{1}{n^2} & 0 & -\frac{1}{\sqrt{2}} r_{41} E_T \\ 0 & \frac{1}{n^2} & \frac{1}{\sqrt{2}} r_{41} E_T \\ -\frac{1}{\sqrt{2}} r_{41} E_T & \frac{1}{\sqrt{2}} r_{41} E_T & \frac{1}{n^2} \end{bmatrix} \quad (2.5)$$

となる。これを屈折率楕円体で表すと、

$$\frac{x^2}{n^2} + \frac{y^2}{n^2} + \frac{z^2}{n^2} + \sqrt{2} r_{41} E_T yz - \sqrt{2} r_{41} E_T zx = 1 \quad (2.6)$$

となる。2回の座標変換

$$\begin{cases} x' = z \\ y' = \frac{1}{\sqrt{2}}(x - y) \\ z' = \frac{1}{\sqrt{2}}(x + y) \end{cases} \quad (2.7)$$

および

$$\begin{cases} x'' = \frac{1}{\sqrt{2}}(x' - y') \\ y'' = \frac{1}{\sqrt{2}}(x' + y') \\ z'' = z' \end{cases} \quad (2.8)$$

を行うことで、式(2.6)を x^2, y^2, z^2 の項のみにできる。この操作は、屈折率テンソルを対角化することに対応する。これにより、

$$\left(\frac{1}{n^2} + r_{41}E_T\right)x''^2 + \left(\frac{1}{n^2} - r_{41}E_T\right)y''^2 + \frac{z''^2}{n^2} = 1 \quad (2.9)$$

を得る。座標系 (x'', y'', z'') は、図2.7に示すとおりである。 x'' 軸は(110)面内にあり、水平方向から反時計回りに 45° 傾いている。 y'' 軸も(110)面内にあり、水平方向から反時計回りに 135° 傾いている。 z'' 軸は(110)方向に一致する。ZnTe結晶の(110)面に入射する光の偏光と屈折率の関係を表したものが図2.8である。テラヘルツ波が入射していないときは、屈折率は円形になるが、テラヘルツ波が入射すると式(2.9)から、屈折率は楕円を描く。 x'', y'', z'' 軸方向の偏光に対する屈折率 $n_{x''}, n_{y''}, n_{z''}$ は、式(2.9)から

$$\begin{cases} n_{x''} = \left(\frac{1}{n^2} + r_{41}E_T\right)^{-2} \approx n - \frac{1}{2}n^3 r_{41}E_T \\ n_{y''} = \left(\frac{1}{n^2} - r_{41}E_T\right)^{-2} \approx n + \frac{1}{2}n^3 r_{41}E_T \\ n_{z''} = n \end{cases} \quad (2.10)$$

となる。偏光の x'' 軸成分と y'' 軸成分では、 $n^3 r_{41}E_T$ だけ屈折率に差が出る。この複屈折性によって、テラヘルツ波が入射しているときとしていないときでは、結晶を透過した光パルスの x'' 軸成分と y'' 軸成分の位相に $\Delta\varphi$ の差異が生じ、偏光が直線偏光から楕円偏光に変化する。ここで、結晶の厚さを L 、真空中での光パルスの波長を λ とすると、

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi\Delta n L}{\lambda} \quad (2.11)$$

$$\Delta n = n_{y''} - n_{x''} = n^3 r_{41}E_T \quad (2.12)$$

である。

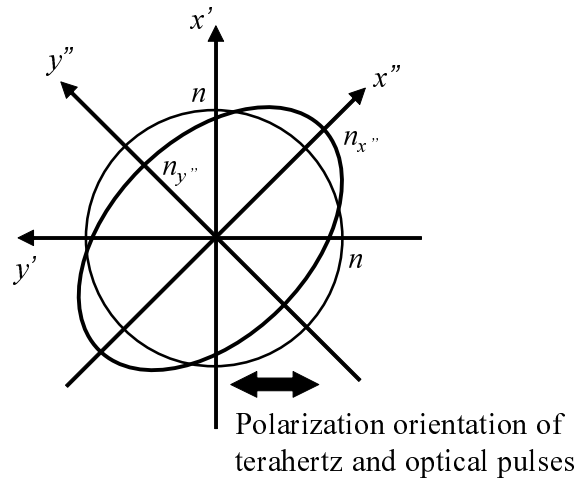


図 2.8. ZnTe 結晶の (110) 面上における光の屈折率

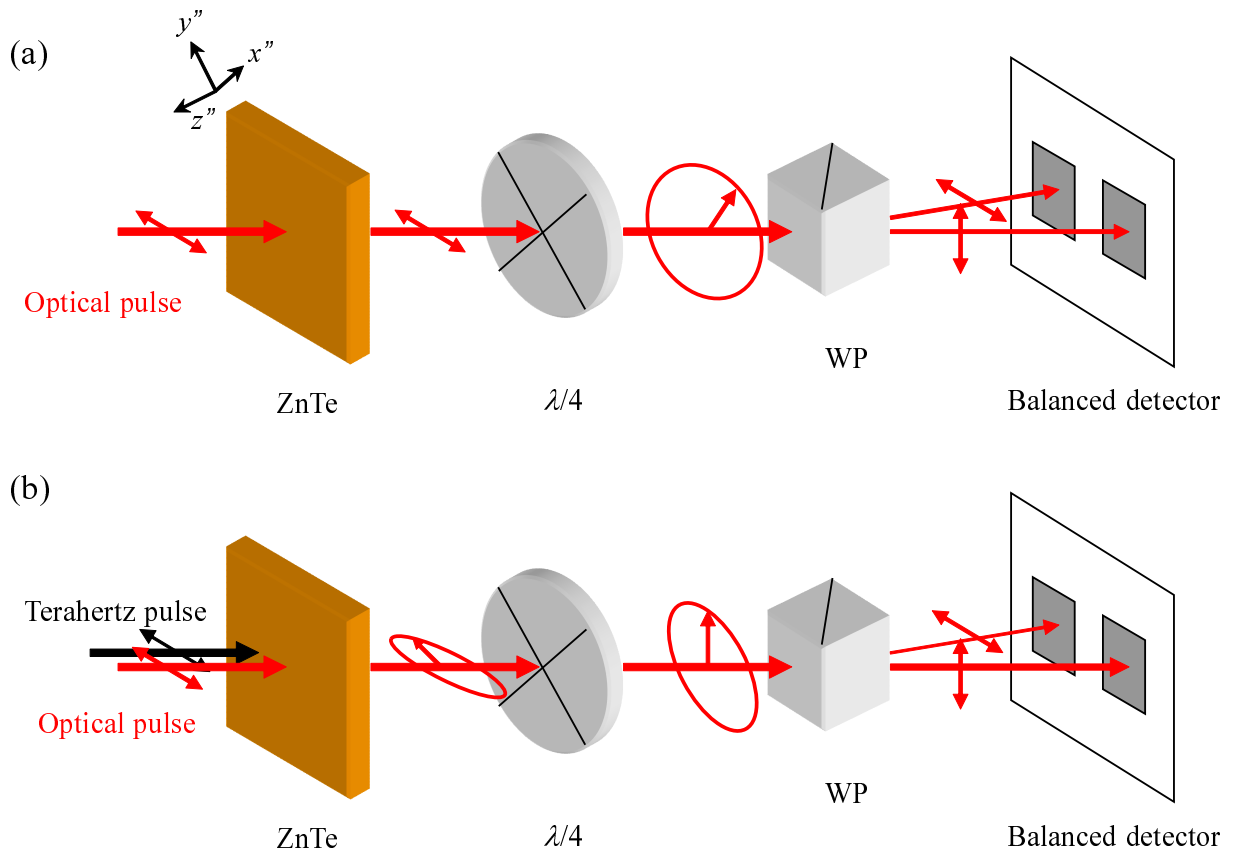


図 2.9. バランス検出の原理図、(a) ZnTe にテラヘルズ波が入射していない場合の光パルスの偏光、(b) テラヘルズ波が入射している場合の光パルスの偏光

この偏光の違いを検出するため、ZnTe 結晶の後に $\lambda/4$ 板、ウォラストンプリズム (WP: wollaston prism) とバランス検出器を配置する。 $\lambda/4$ 板の速軸は ZnTe の x'' 軸と同じになるようにする。それぞれの素子による偏光の変化を図 2.9 に示す。ZnTe にテラヘルツ波が入射していない場合 (図 2.9(a)) は、ZnTe に複屈折性が生じていないので、これによる光パルスの偏光の変化はなく、 $\lambda/4$ 板によって円偏光となる。WP により円偏光の光パルスは水平偏光と鉛直偏光に分離され、バランス検出器により両成分の光量差が検出される。円偏光は水平偏光と鉛直偏光の振幅が等しいので、バランス検出器の信号は 0 である。一方、ZnTe にテラヘルツ波が入射している場合 (図 2.9(b)) は、ZnTe の複屈折性により、ZnTe を透過した光パルスの偏光が楕円偏光となる。 $\lambda/4$ 板を透過後の偏光も楕円偏光であり、WP によって水平偏光と鉛直偏光に分離される。楕円偏光は、水平偏光と鉛直偏光の振幅が異なるので、バランス検出器の信号は 0 ではない。バランス検出器で検出される水平偏光と鉛直偏光の光量差は、Jones ベクトルを用いて計算できる。 $\lambda/4$ 板を透過した後の光パルスの偏光は、

$$R\left(-\frac{\pi}{4}\right) \begin{bmatrix} e^{-i\frac{\pi}{4}} & 0 \\ 0 & e^{i\frac{\pi}{4}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e^{-i\frac{\Delta\varphi}{2}} & 0 \\ 0 & e^{i\frac{\Delta\varphi}{2}} \end{bmatrix} R\left(\frac{\pi}{4}\right) \begin{bmatrix} E_0 \\ 0 \end{bmatrix} = E_0 \begin{bmatrix} \cos\left(\frac{\Delta\varphi}{2} + \frac{\pi}{4}\right) \\ -i \sin\left(\frac{\Delta\varphi}{2} + \frac{\pi}{4}\right) \end{bmatrix} \quad (2.13)$$

となる。ここで、 $\begin{bmatrix} E_0 \\ 0 \end{bmatrix}$ は ZnTe 結晶に入射する光パルスである。 $R(\theta)$ は座標軸を θ だけ反時計回りに回転することを表しており、

$$R(\theta) = \begin{bmatrix} \cos\theta & \sin\theta \\ -\sin\theta & \cos\theta \end{bmatrix} \quad (2.14)$$

である。また、 $\begin{bmatrix} e^{-i\frac{\Delta\varphi}{2}} & 0 \\ 0 & e^{i\frac{\Delta\varphi}{2}} \end{bmatrix}$ は ZnTe 結晶、 $\begin{bmatrix} e^{-i\frac{\pi}{4}} & 0 \\ 0 & e^{i\frac{\pi}{4}} \end{bmatrix}$ は $\lambda/4$ 板に対応する。バランス検出器で検出される水平偏光と鉛直偏光のエネルギーの差は、

$$\begin{aligned} \Delta I &= I_0 \sin^2\left(\frac{\Delta\varphi}{2} + \frac{\pi}{4}\right) - I_0 \cos^2\left(\frac{\Delta\varphi}{2} + \frac{\pi}{4}\right) \\ &= I_0 \sin \Delta\varphi \end{aligned} \quad (2.15)$$

となる。実際に実験で測定される信号は、 I_0 に対して ΔI は十分小さいので、 ΔI と $\Delta\varphi$ は比例関係にあるとみなせる。式 (2.11), (2.12) より、 E_T と $\Delta\varphi$ はほぼ比例するので、 ΔI と E_T は比例す

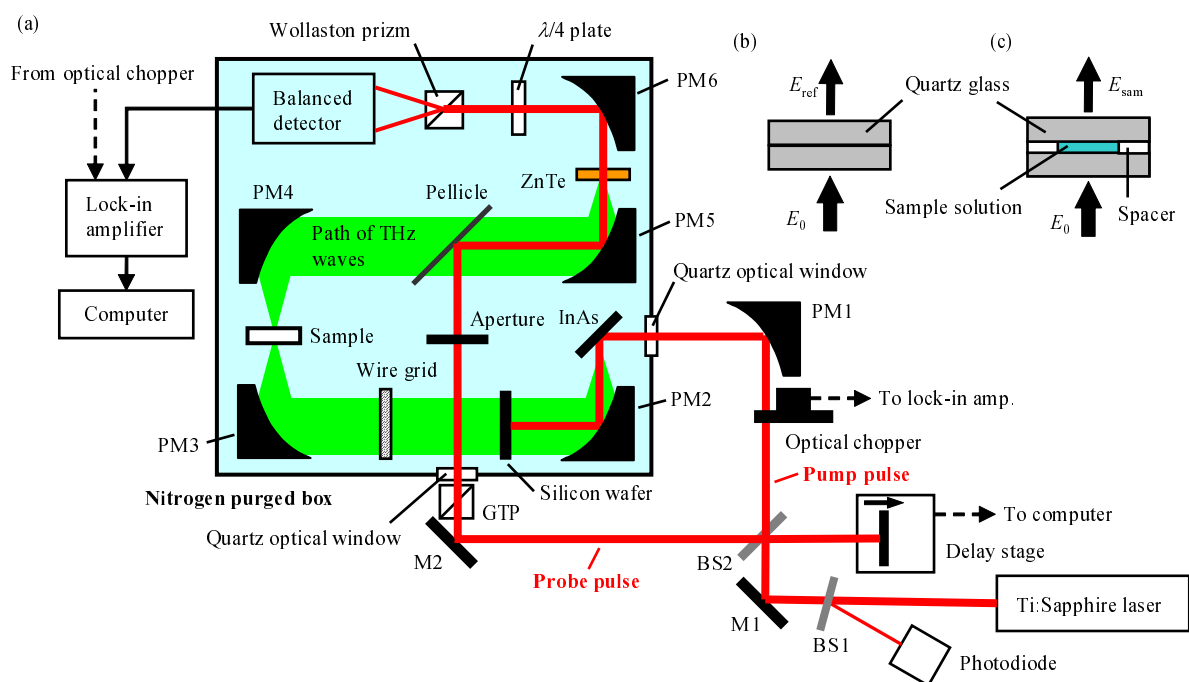


図 2.10. 本研究で用いた (a) テラヘルズ時間領域分光法の光学系と (b) 参照用セルおよび (c) サンプルセルの構造

ると考えてよい。 ΔI を測定することにより、間接的にテラヘルズ波の電場 E_T を検出することができる。

2.2.3 光学系

本実験で用いた光学系を図 2.10 に示す。光源には Ti:Sapphire レーザー (パルス幅 10.6 fs, 出力 470 mW, 中心波長 780 nm, 繰返し周期 75.1 MHz, Femtsource Scientific Pro, FEMTOLASERS, Austria) にモード同期をかけて使用した。得られる光パルスの偏光は水平偏光である。光パルスはビームスプリッタ (BS: beam splitter)1 で 2 つに分けた。はねた光の強度はフォトダイオードで観測し、テラヘルズ波の強度の補正に用いた (2.2.7 節参照)。もう一方の光パルスは、BS2 でポンプパルスとプローブパルスに光量比 9:1 の割合で分けられる。

ポンプパルスは、チョッパーにより周波数 2500 Hz で変調され、軸外し放物面鏡 (PM: off-axis parabolic mirror)1 により InAs 結晶の (111) 面に入射角 45° で入射する。これにより、パルス状のテラヘルズ波が発生する。ここで、PM1 の軸外し焦点距離 $f' = 8$ inch (203.2 mm) であり、PM1 から InAs までの距離は 225 mm である。PM1 の焦点距離と InAs までの距離が異なるのは、ポン

パルスのスポットサイズが、発生するテラヘルツ波の波長程度のときにテラヘルツ波の強度が最大になるためである [90]。また、本光学系で使用している放物面鏡の直径は全て1インチであり、全ての放物面鏡の反射面に金薄膜が蒸着してあり、その上に MgO 保護膜によるコーティングが施してある。反射面の蒸着膜を金にすることで、Ti:Sapphire レーザーの光に対する反射率が大きくなり、MgO 保護膜により、金薄膜のさびつきを防止することができる。保護膜によるテラヘルツ波への影響はほとんどないものと考えられる [91]。InAs 結晶から放射されるテラヘルツパルスは、PM2 ($f' = 1$ inch) により平行波となる。高抵抗シリコンウェハは、InAs で反射したポンプパルスを遮断し、テラヘルツ波のみを透過するものである。シリコンウェハを透過したテラヘルツパルスはワイヤーグリッドにより水平偏光となり、PM3 ($f' = 2$ inch) によって集光されて試料に入射し、PM4 ($f' = 2$ inch) によって再び平行波となる。そして、PM5 ($f' = 1$ inch) によって厚さ1 mm の ZnTe 結晶の (110) 面上に集光される。一方、プローブパルスは、遅延ステージでポンプパルスに対して時間遅延をもつ。その後、グランテーラープリズム (GTP: Glan-Taylor prism) で水平偏光成分のみとなり、しぼりでビーム径をしぼった後にペリクルでテラヘルツ波と重ね合わせられ、PM5 により ZnTe 上に集光される。ペリクルは、テラヘルツ波を透過させ、Ti:Sapphire レーザーの光を 45 % 反射する。また、プローブパルスをしぼりでしぼることで、経験的に測定ノイズを低減できる。BS から ZnTe までの距離は、ポンプ (テラヘルツ) パルスに対してもプローブパルスに対しても 725 mm であるので、テラヘルツパルスとプローブパルスは ZnTe 表面にほぼ同時に到着する。ZnTe に入射したプローブパルスは 2.2.2 節で述べた原理によってテラヘルツ波の電場の大きさとして検出される。信号の検出にはロックインアンプとチョッパーを用い、外部ノイズの影響を受けずに測定を行った。ロックインアンプの時定数は 100 ms、遅延ステージの移動から次の移動までの時間は 50 ms とした。

テラヘルツ波は、水に強く吸収されるという特徴を持っており、大気中の水蒸気によっても吸収される。本実験では、大気中の水蒸気の影響を抑えるため、テラヘルツ波の発生から検出までを N₂ パージした箱の中で行った。窒素は液体窒素を蒸発させて使用した。窒素を箱に流し始めてから 10 分程度で箱の中の湿度を 5 % 以下にできる。箱内に湿度は、デジタル温湿度計 (CTH-1365, カスタム社製) を用いて測定した。(この温湿度計で測定できる湿度は 5 % から 95 % であるが、5 % 以下の値も表示される。実際の測定では湿度計の表示が 3.0 % 以下の状態で行った。) 本実験の測定温度 (パージ箱内の温度) は 18.5 °C から 20.5 °C の範囲であった。この温度は、パージ箱に流す窒素ガスの温度を調節することはせず、実験室の空調を常に冷房 20 °C に設定することで

実現している。温度は、湿度と同様に、デジタル温湿度計で測定した。なお、N₂ パージの箱にポンプパルスとプローブパルスが突入する際、オプティカルウィンドウ (OW: optical window, 厚さ 6.35 mm、合成石英) を透過する。OW の群速度分散により、ポンプパルスおよびプローブパルスのパルス幅は 58 fs 程度になる [92]。

2.2.4 テラヘルツ時間領域分光法の原理

テラヘルツパルスのパルス幅は 1 ps 程度であり、その振動は極めて速いので、テラヘルツ電場の時間波形を実時間で測定することはほぼ不可能である。THz-TDS では、遅延ステージを使用してテラヘルツ (ポンプ) パルスとプローブパルスの間に時間遅延を生じさせることで時間波形の測定を行っている。その原理を図 2.11 に示す。図 2.11(a) は ZnTe 結晶上に到着するテラヘルツパルスとプローブパルスの時間波形を示したものである。本実験では、ZnTe 表面におけるテラヘルツパルスのパルス幅が 1 ps 程度であるのに対し、プローブパルスのパルス幅は 58 fs 程度である。すなわち、テラヘルツパルスの電場の時間変化に対して、プローブパルスの電場の時間変化は一瞬である。時刻 t_0 に ZnTe 表面に到達したプローブパルスは、テラヘルツ電場の時間波形の 1 点をとらえることができる。これは、EO サンプルング法が時間応答の速い検出法であることにもよる。次に、図 2.10 に示す遅延ステージを右にわずかに移動させるとプローブパルスの光路長が長くなる。これにより、プローブパルスはテラヘルツパルスに対して Δt だけ時間遅延を伴って ZnTe に到達する。 Δt だけ時間遅延を伴ったプローブパルスは、テラヘルツ電場の時間波形のうち、前回よりも Δt 遅れた点の電場を検出する。さらに遅延ステージを右へ動かすと、さらに Δt 遅れた点のテラヘルツパルスの電場を検出できる。これを繰り返すことで、図 2.11(b) のようなテラヘルツパルスの時間波形を測定できる。測定の時間ステップ Δt は、遅延ステージを動かす距離によって決まる。本実験における遅延ステージの移動距離は 1 $\mu\text{m}/\text{step}$ である。遅延ステージが 1 μm 移動すると、プローブパルスの光路長は 2 μm 長くなる。2 μm の距離を光が伝播するのにかかる時間は 6.67 fs であり、これが本実験で測定した時間波形の時間ステップである。本実験では、テラヘルツパルスを含む 16.7 ps 間の時間波形を測定したが、1 つの波形に含まれる測定点の数は 2500 個である。遅延ステージのステップによらず、1 つの点を測定するのに 50 ms かかるので、1 つの波形を測定するのにかかる時間は $50 \text{ ms} \times 2500 = 125 \text{ s}$ である。

THz-TDS では、得られたテラヘルツパルスの時間波形を

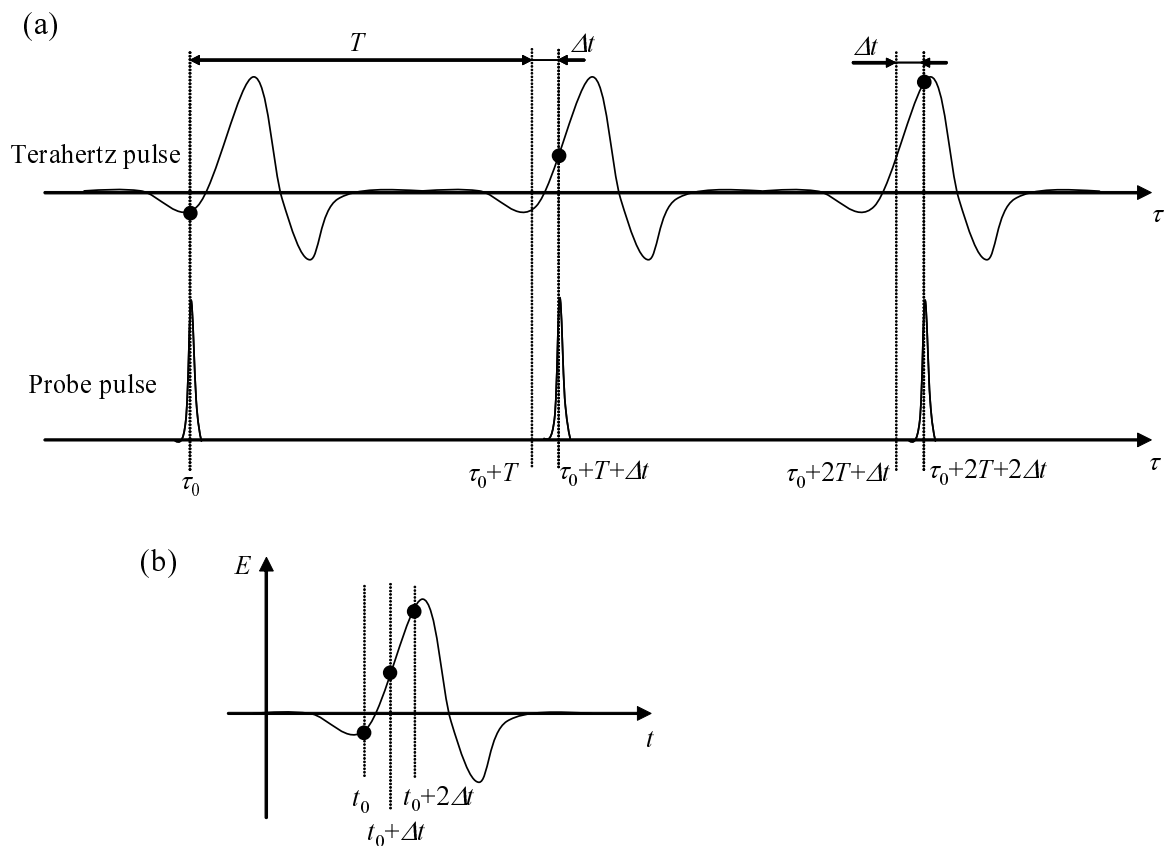


図 2.11. テラヘルツ時間領域分光法でテラヘルツ電場の時間波形を測定する原理、(a) ZnTe 結晶上に到着するテラヘルツパルスとプローブパルスのタイミング、(b) 測定されるテラヘルツ電場の時間波形

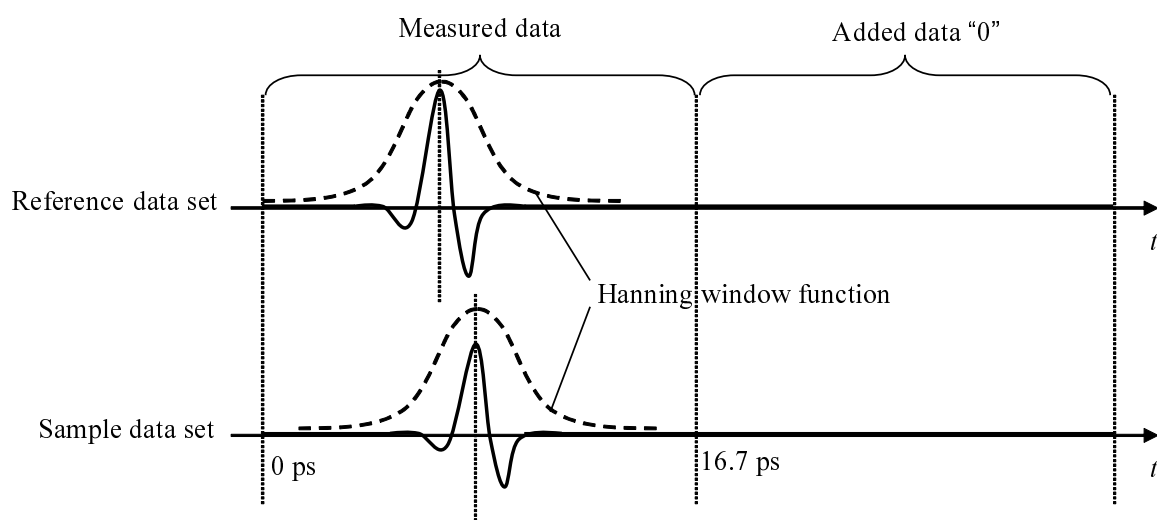


図 2.12. 測定データの取り扱い（データ"0"の追加とハニング窓関数のかけ方）

$$E(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} E(t) e^{-i\omega t} dt \quad (2.16)$$

によりフーリエ変換することにより、テラヘルツパルスの振動数領域のスペクトルに変換する。本実験では高速フーリエ変換 (FFT: fast Fourier transform) によりフーリエ変換を行った。FFT では、データの数は2の累乗個でなければならない。そこで、図 2.12 に示すように、測定した時間波形のデータの後に0を付け加え、データの数を調整した。実験で測定した電場の時間波形は、テラヘルツパルスを含む 16.7 ps 間の波形であり、2500 個のデータからなる。そのデータの後に0を付け加え、データ数を 16384 個とした。その後、図 2.12 に示すように、ハニング窓関数

$$w(t) = \frac{1 - \cos \frac{2\pi t}{T}}{2} \quad (2.17)$$

をかけて FFT を行った。ここで、 T は窓関数の幅であり、本研究では 6.671 ps とした。テラヘルツパルスのピークとハニング窓関数のピークが一致するように窓関数をかけた。ピーク位置は、観測された電場が最大となる位置の時間とした。分光測定では、試料を透過していないテラヘルツ波 (参照波) と試料を透過したテラヘルツ波を測定するが、参照波と試料透過波では、試料透過波のほうが参照波よりもテラヘルツパルスが遅れて検出される。このような場合も、ハニング窓関数もテラヘルツパルスが遅れた分だけ遅らせ、テラヘルツパルスのピークとハニング窓関数のピークが一致するように窓関数をかけた。本研究では、精度よくスペクトルを測定するために、スペクトルの積算を行った。参照波と試料透過波を交互に 10 回測定した。複数回測定した参照波どうしまたは試料透過波どうしで波形のピークを比較すると、ノイズなどの影響でピーク位置が同じ位置に来ないことがある。それぞれのピークごとに窓関数の位置を変えると、窓関数の位置の違いによる影響が得られるスペクトルに現れると考えられる。そこで、本研究では 10 回測定した参照波や試料透過波をそれぞれ平均し、平均後の波形のピーク位置を求めた。参照波にかける窓関数のピーク位置は、測定した参照波波形を平均した波形のピーク位置とし、試料透過波にかける窓関数のピーク位置は、測定した試料透過波の波形を平均した波形のピーク位置とした。平均前のそれぞれの時間波形に、得られたピーク位置を中心とする窓関数をかけて、それぞれの波形をフーリエ変換をした。フーリエ変換後のスペクトルのデータ間隔は、 $1/(16384 \times 6.67 \text{ fs}) = 9.15 \times 10^{-3} \text{ THz}$ となる。

分光測定をする試料には最低 2 つの界面が存在する。最も簡単な界面を 2 つしか持たない板状

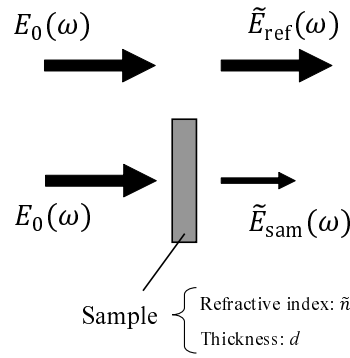


図 2.13. 試料透過波と参照波

の試料を考える。このとき観測されるテラヘルツ波の波形には、2つの界面を透過するテラヘルツ波のほかに、2つの界面間を1回ずつ反射するテラヘルツ波、2回ずつ反射するテラヘルツ波、…、が観測される。このような多重反射波が時間波形に含まれていると、試料のスペクトルに揺らぎを与える。メインのテラヘルツパルスと多重反射したテラヘルツパルスが時間的に十分間隔をあけて観測されれば、窓関数の幅を多重反射したテラヘルツパルスにかからないようにすることで、多重反射波の影響を除くことができる。メインのテラヘルツパルスと多重反射したテラヘルツパルスとの時間間隔が十分でない場合、2.2.6節で述べるような、多重反射波を考慮に入れた解析を行う必要がある。

次に、図 2.13 に示すような厚さ d の板状の試料の屈折率 n と吸収係数 α の求め方 [50, 93] を示す。テラヘルツ波は試料に垂直に入射するものとし、試料の複素屈折率を \tilde{n} とする。複素屈折率は $\tilde{n} = n + i\kappa$ で定義され、 n は実屈折率、 κ は消衰係数である。まず、試料を透過したテラヘルツ波 $\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega)$ と参照波 $\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega)$ を測定する。参照波は試料の厚さと同じ距離だけ空气中を伝播したテラヘルツ波とする。 $\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega)$ と $\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega)$ はそれぞれ次のように書ける。

$$\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega) = e^{i\frac{2\pi\nu d}{c}} E_0 \quad (2.18)$$

$$\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega) = \frac{2}{1 + \tilde{n}(\omega)} e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}(\omega)d}{c}} \frac{2\tilde{n}(\omega)}{1 + \tilde{n}(\omega)} E_0 \quad (2.19)$$

ここで、 c は光速、 E_0 は入射するテラヘルツ波の振幅、 $\frac{2}{1 + \tilde{n}(\omega)}$ は空気-試料界面のテラヘルツ波の透過係数、 $\frac{2\tilde{n}(\omega)}{1 + \tilde{n}(\omega)}$ は試料-空気界面のテラヘルツ波の透過係数、 $e^{i\frac{2\pi\nu d}{c}}$ は空气中を距離 d を進んだときのテラヘルツ波の位相変化、 $e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}(\omega)d}{c}}$ は試料内におけるテラヘルツ波の位相変化を表している。試料透過波と参照波の比をとると次のようになる。

$$\frac{\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega)}{\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega)} = \frac{4\tilde{n}(\omega)}{(1+\tilde{n}(\omega))^2} e^{i\frac{2\pi\nu(\tilde{n}(\omega)-1)d}{c}} \equiv t(\omega)e^{i\Delta\phi(\omega)} \quad (2.20)$$

左辺と中辺は複素数であり、右辺のように大きさ $t(\omega)$ と偏角 $\Delta\phi(\omega)$ に成分に分解できる。実際に $\Delta\phi(\omega)$ と $t(\omega)$ を計算すると、

$$\Delta\phi(\omega) = \frac{2\pi\nu(n(\omega)-1)d}{c} + \arg\left\{\frac{4\tilde{n}(\omega)}{(1+\tilde{n}(\omega))^2}\right\} \quad (2.21)$$

$$t(\omega) = \left|\frac{4\tilde{n}(\omega)}{(1+\tilde{n}(\omega))^2}\right| e^{-\frac{2\pi\nu\kappa(\omega)d}{c}} \quad (2.22)$$

となる。 $\arg\{\}$ は複素数の偏角を表す。式 (2.21) と (2.22) を、 \tilde{n} を独立変数とみなして、それぞれ n と κ について解くと、

$$n(\omega) = \frac{c}{2\pi\nu d} \left[\Delta\phi(\omega) - \arg\left\{\frac{4\tilde{n}(\omega)}{(1+\tilde{n}(\omega))^2}\right\} \right] + 1 \quad (2.23)$$

$$\kappa(\omega) = -\frac{c}{2\pi\nu d} \log \frac{t(\omega)}{\left|\frac{4\tilde{n}(\omega)}{(1+\tilde{n}(\omega))^2}\right|} \quad (2.24)$$

となる。多くの試料は、 n に対して κ は小さいので、式 (2.23) の $\arg\{\}$ の項を 0、式 (2.24) で $\text{Im}\{\tilde{n}\} = 0$ とすると、 n と κ は、

$$n(\omega) = \frac{c\Delta\phi(\omega)}{2\pi\nu d} + 1 \quad (2.25)$$

$$\kappa(\omega) = -\frac{c}{2\pi\nu d} \log \frac{t(\omega)}{\frac{4n(\omega)}{(1+n(\omega))^2}} \quad (2.26)$$

となる。式 (2.23) と (2.24) は、自己無撞着型の式であり、これらの式に式 (2.25) と (2.26) で得られた n と κ の値を代入し、新たな n と κ の値を求め、さらにその得られた値を式 (2.23) と (2.24) に代入して新たな n と κ の値を得る操作を繰り返すことで、正確な n と κ の値により近い値を得ることができる。本研究では、この操作を 1000 回繰り返すことである一定の値に収束することを確認した。吸収係数 α と消衰係数 κ との間には、

$$\kappa = \frac{\alpha c}{4\pi\nu} \quad (2.27)$$

の関係がある。この関係から、式 (2.24) は、

$$\alpha(\omega) = -\frac{2}{d} \log \left| \frac{t(\omega)}{\frac{4\tilde{n}(\omega)}{(1+\tilde{n}(\omega))^2}} \right| \quad (2.28)$$

とかける。

ここで導いた式は試料セルに用いた石英基板の屈折率を求めるために用いた。実際に本実験で用いた水溶液の吸収係数の計算式は、試料セルの構造を考慮して計算する必要がある。修正した式は 2.2.6 節に示す。

2.2.5 試料セル

水はテラヘルツ波を強く吸収することから、試料の厚さを十分薄くする必要がある。本実験では、試料を封入するセルの厚さを 0.10 mm とした。作製したセルの構造を図 2.10 に示す。図 2.10(b) は参照波測定時、図 2.10(c) は溶液を封入したときのセルの構造である。セルの材質は合成石英を用いた。合成石英はテラヘルツ帯における屈折率が 2 でほぼ一定であり、テラヘルツ波をほとんど吸収しない (図 2.25 を参照)。石英基板の形状は円形であり、直径 20 mm、厚さ 1 mm である。参照波を測定では、2 枚の石英基板をくっつけて隙間を作らないようにしたものを用い、これを透過したテラヘルツ波を測定した。隙間がないことは干渉縞の有無により判断した。溶液を封入する際には、石英基板の間にリング状のスペーサーを挟むことで溶液の入る空間を確保した。サンプルスペースにおけるテラヘルツ波のビーム径が約 3 mm であることから、スペーサーの穴の直径を 7 mm とした。スペーサーの素材はポリテトラフルオロエチレン (通称 Teflon[®]) とした。テフロンは、テラヘルツ波を吸収しないことで知られる素材である。テフロンスペーサーは全て同一のシートから切り出し、厚さは 0.100 ± 0.001 mm であった。スペーサーの穴は、皮ポンチを用いて開けた。石英基板とテフロンスペーサーは、薄めた中性洗剤を綿棒に含ませて基板に塗布し、純水でよく洗い流した。その後、アセトンを含ませたコットンで軽く拭いて水分を蒸発させた。石英基板の上にスペーサーを置き、マイクロピペットで試料水溶液を 50 μ L 量りとして石英基板上に滴下し、もう一枚の石英基板を気泡が入らないようにかぶせた。参照波の場合も溶液が入って

いる場合も、セルの周りをパラフィルムで巻いて基板を固定した。特に溶液が入っている場合は、フィルムを巻くことで水分の蒸発を防ぎ、水溶液の濃度を一定に保つ効果もある。最後に、セルの表面を純水で洗い流し、洗剤を綿棒に含ませてセル表面に塗布し、純水で再び良く洗い流した。その後、アセトンを含ませたコットンで水分を蒸発させた。

作成したセルは、専用の試料回転子にセットした。試料回転子は、窒素パージをしているときに箱を開けなくても自動的に試料を交換することができる。試料回転子の制御は LabVIEW™ により行った。参照用基板と試料セルをあらかじめ回転子にセットしておき、これらを自動的に交換してスペクトルの積算を行った。参照波と試料透過波を交互に測定することで、レーザー強度の時間変化の影響を最小限できると期待できる。参照波と試料透過波を交互に測定ことは、本手法が透過型光学系を採用したことにより可能となっている。水溶液のテラヘルツ分光で良く採用される ATR 光学系では、試料の交換が容易ではない。試料の交換の度に窒素パージを開放しプリズムの清掃を行う必要がある。透過型光学系は、簡便な光学系でスペクトルの積算が可能である。これは透過型光学系を用いる利点であるといえる。

2.2.6 試料水溶液の屈折率と吸収係数

図 2.13 に示すような界面が 2 つしかない試料の場合には、吸収係数は式 (2.28) で計算できるが、本実験で用いた試料セルは界面の数が多いため、それらの界面で透過や界面間で多重反射するテラヘルツ波を考慮しなければならない。試料セルに封入される溶液試料の厚さは 0.1 mm であり、入射したテラヘルツパルスは 2 枚の石英基板間で繰り返し反射する。この反射によりテラヘルツ波の干渉が起こり、スペクトルに周期的な揺らぎが生じる。そのため、文献 [94] で報告されているように、基板間の多重反射を考慮した解析を行う必要がある。さらに、試料セルの基板と参照用基板は、同時に試料回転子にセットしなければならないので、試料セルの基板と参照用基板はそれぞれ別に用意しなければならない。このとき、試料セルの基板の厚さと参照用基板の厚さが完全に等しいことはないので、この厚さの差がスペクトルに与える影響を補正する必要がある。本研究では、参照用基板透過波と試料透過波の測定 (図 2.14(a)) に加え、参照用基板の透過波と試料厚さ 0 mm の試料セルの透過波の測定 (図 2.14(b)) を行い、基板の厚さの違いにより生じる影響を補正した。

参照用基板の厚さ (2 枚はり合わせた状態) を d_1 、試料セルの基板の厚さ (2 枚はり合わせた状

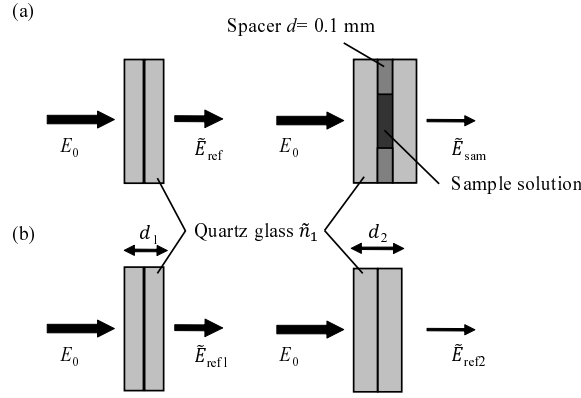


図 2.14. (a) 水溶液試料のテラヘルツ分光、(b) 基板の厚さの違いの補正のためのデータの測定におけるセルの構造

態) を d_2 、試料水溶液の厚さを d 、石英基板の屈折率を \tilde{n}_1 として、水溶液試料の n と α を、文献 [94] に従って導く。図 2.14(a) のように参照用基板透過波 $\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega)$ を参照波として試料セル透過波 $\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega)$ を測定する。 $\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega)$ と $\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega)$ は次のように書ける。

$$\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega) = \frac{4\tilde{n}_1(\omega)}{(1 + \tilde{n}_1(\omega))^2} e^{i\frac{2\pi\nu d}{c}} e^{i\frac{2\pi\nu(d_2-d_1)}{c}} e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}_1(\omega)d_1}{c}} E_0 \quad (2.29)$$

$$\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega) = \frac{4\tilde{n}_1(\omega)}{(1 + \tilde{n}_1(\omega))^2} \frac{4\tilde{n}_1(\omega)\tilde{n}(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + \tilde{n}(\omega))^2} e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}(\omega)d}{c}} M e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}_1(\omega)d_2}{c}} E_0 \quad (2.30)$$

ここで、 $\tilde{n}(\omega)$ は試料の複素屈折率であり、 $d_2 > d_1$ の場合を考えた。 $\frac{4\tilde{n}_1(\omega)}{(1 + \tilde{n}_1(\omega))^2}$ は空気 - 石英基板および石英基板 - 空気境界面の透過係数の積であり、 $\frac{4\tilde{n}_1(\omega)\tilde{n}(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + \tilde{n}(\omega))^2}$ は石英基板 - 溶液試料および溶液試料 - 石英基板境界面の透過係数の積である。 $e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}(\omega)d}{c}}$ は溶液試料によるテラヘルツ波の減衰と位相の遅れを表しており、 $e^{i\frac{2\pi\nu d}{c}}$ は溶液試料の厚さだけテラヘルツ波が空气中を伝搬したときの位相の遅れを、 $e^{i\frac{2\pi\nu(d_2-d_1)}{c}}$ は試料セルの基板と参照用の基板との厚さの差分だけテラヘルツ波が空气中を伝搬したときの位相の遅れを表している。 $e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}_1(\omega)d_1}{c}}$ と $e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}_1(\omega)d_2}{c}}$ は石英基板による位相の遅れである。また、 M は繰り返し反射を表す因数であり、

$$M = \left\{ 1 - \left(\frac{\tilde{n}(\omega) - \tilde{n}_1(\omega)}{\tilde{n}(\omega) + \tilde{n}_1(\omega)} \right)^2 e^{i\frac{4\pi\nu\tilde{n}(\omega)d}{c}} \right\}^{-1} \quad (2.31)$$

で表される [94]。 $\left(\frac{\tilde{n}(\omega) - \tilde{n}_1(\omega)}{\tilde{n}(\omega) + \tilde{n}_1(\omega)} \right)^2$ が石英基板 - 溶液試料境界面の反射係数の積であり、 $e^{i\frac{4\pi\nu\tilde{n}(\omega)d}{c}}$ は石英基板間をテラヘルツ波が往復する際の減衰と位相の遅れを表している。式 (2.31) は、テラ

ヘルツ波が無限回石英基板間で反射すると仮定おり、無限等比級数の和の形をしている。ここで、式 (2.29) と (2.30) の比をとると

$$\frac{\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega)}{\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega)} = \frac{4\tilde{n}_1(\omega)\tilde{n}(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + \tilde{n}(\omega))^2} e^{i\frac{2\pi\nu(\tilde{n}(\omega)-1)d}{c}} e^{-i\frac{2\pi\nu(d_2-d_1)}{c}} M e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}_1(\omega)(d_2-d_1)}{c}} \quad (2.32)$$

となる。

また、図 2.14(b) のように参照用基板透過波 $\tilde{E}_{\text{ref1}}(\omega)$ を参照波として試料厚さ 0 mm の試料セル透過波 $\tilde{E}_{\text{ref2}}(\omega)$ を測定する。 $\tilde{E}_{\text{ref1}}(\omega)$ と $\tilde{E}_{\text{ref2}}(\omega)$ は次のように書ける。

$$\tilde{E}_{\text{ref1}}(\omega) = \frac{4\tilde{n}_1(\omega)}{(1 + \tilde{n}_1(\omega))^2} e^{i\frac{2\pi\nu d}{c}} e^{i\frac{2\pi\nu(d_2-d_1)}{c}} e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}_1(\omega)d_1}{c}} E_0 \quad (2.33)$$

$$\tilde{E}_{\text{ref2}}(\omega) = \frac{4\tilde{n}_1(\omega)}{(1 + \tilde{n}_1(\omega))^2} e^{i\frac{2\pi\nu d}{c}} e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}_1(\omega)d_2}{c}} E_0 \quad (2.34)$$

ここで、式 (2.33) と (2.34) の比をとると

$$\frac{\tilde{E}_{\text{ref2}}(\omega)}{\tilde{E}_{\text{ref1}}(\omega)} = e^{i\frac{2\pi\nu\tilde{n}_1(\omega)(d_2-d_1)}{c}} e^{-i\frac{2\pi\nu(d_2-d_1)}{c}} \quad (2.35)$$

となる。ここでさらに、式 (2.32) と (2.35) との比をとると次のようになる。

$$\frac{\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega)}{\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega)} = \frac{4\tilde{n}_1(\omega)\tilde{n}(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + \tilde{n}(\omega))^2} e^{i\frac{2\pi\nu(\tilde{n}(\omega)-1)d}{c}} M \equiv t_C(\omega) e^{i\Delta\phi_C(\omega)} \quad (2.36)$$

式 (2.32) と (2.35) との比は複素数であり、大きさ $t_C(\omega)$ と偏角 $\Delta\phi_C(\omega)$ に成分に分解できる。実際に $\Delta\phi_C(\omega)$ と $t_C(\omega)$ を計算すると、

$$\Delta\phi_C(\omega) = \frac{2\pi\nu(n(\omega) - 1)d}{c} + \arg \left\{ \frac{4\tilde{n}_1(\omega)\tilde{n}(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + \tilde{n}(\omega))^2} M \right\} \quad (2.37)$$

$$t_C(\omega) = e^{-\frac{2\pi\nu\kappa(\omega)d}{c}} \left| \frac{4\tilde{n}_1(\omega)\tilde{n}(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + \tilde{n}(\omega))^2} M \right| \quad (2.38)$$

となる。 \tilde{n} を独立変数とみなして n と κ について解くことで以下の式を得る。

$$n(\omega) = \frac{c}{2\pi\nu d} \left[\Delta\phi_C(\omega) - \arg \left\{ \frac{4\tilde{n}_1(\omega)\tilde{n}(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + \tilde{n}(\omega))^2} M \right\} \right] + 1 \quad (2.39)$$

$$\kappa(\omega) = -\frac{c}{2\pi\nu d} \log \left| \frac{t_C(\omega)}{\frac{4\tilde{n}_1(\omega)\tilde{n}(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + \tilde{n}(\omega))^2} M} \right| \quad (2.40)$$

はじめ、大体の n と κ の値を得るために、式 (2.39) において $\arg\{ \} = 0$ 、式 (2.40) において $\text{Im}\{\tilde{n}\} = 0$ および $M = 1$ とおくと、式 (2.39) は式 (2.41) のようになり、これは式 (2.25) と全く同じ式である。式 (2.40) は式 (2.42) のようになる。

$$n(\omega) = \frac{c \Delta\phi_C(\omega)}{2\pi\nu d} + 1 \quad (2.41)$$

$$\kappa(\omega) = -\frac{c}{2\pi\nu d} \log \left| \frac{t_C(\omega)}{\frac{4\tilde{n}_1(\omega)n(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + n(\omega))^2}} \right| \quad (2.42)$$

これらの式を用いることで得られる値を式 (2.39)、(2.40) に代入することで、新たな n と κ の値が得られる。この操作を何度も繰り返すことで、石英基板-試料水溶液界面間でのテラヘルツ波の多重反射の影響を取り除かれ、正確な n と κ により近い値を得ることができる。本実験では、この操作を 1000 回適用することで n と κ は一定の値に収束することを確認した。なお、石英基板の厚さは 1 mm であるので、石英基板内で反射したテラヘルツパルスは、どの界面でも反射せずにセル透過したテラヘルツパルスよりも 13.3 ps 遅れて観測される。反射したテラヘルツパルスは、本実験でハニグ窓関数をかけた領域の外側にあるので、石英基板内での反射は本実験には影響せず、考慮する必要はない。式 (2.27) と式 (2.40) から α は

$$\alpha(\omega) = -\frac{2}{d} \log \left| \frac{t_C(\omega)}{\frac{4\tilde{n}_1(\omega)\tilde{n}(\omega)}{(\tilde{n}_1(\omega) + \tilde{n}(\omega))^2} M} \right| \quad (2.43)$$

となる。

2.2.7 装置の高精度化とスペクトルの測定例

水は、テラヘルツ帯において強い吸収を持つ。水溶液の吸収はほとんど水である。溶質や水和水の吸収はバルク水よりも小さい。水溶液中のタンパク質の水和を調べるためには、高精度な測

定装置が要求される。測定装置に由来する誤差の要因として、レーザー強度の時間変化、温度、試料の厚さの誤差、セルへのテラヘルツ波の入射角が垂直でないことなどが挙げられる。試料の厚さの誤差は、主にスペーサーの厚さの誤差によるものである。試料の厚さの誤差により生じる吸収係数の誤差は、式 (2.43) から、 $M = 1$ とすると

$$\delta\alpha = \frac{\alpha}{d} \delta d \quad (2.44)$$

であるので、

$$\frac{\delta\alpha}{\alpha} = \frac{\delta d}{d} \quad (2.45)$$

とかける。この式は、厚さの誤差率がそのまま吸収の誤差率になることを示している。スペーサーの厚さはマイクロメーターによる測定で 0.100 ± 0.001 mm であったので、厚さの誤差による吸収の誤差は 1 % 程度である。本研究では全ての測定で同じテフロンシートから切り出したスペーサーを用いていることから、試料の厚さの誤差は、全ての測定に同じように乗ると考えられ、系統誤差に分類されると考えられる。次に、テラヘルツ波の入射角が垂直 ($\theta = 0$) でないことによる誤差を考える。試料セルへのテラヘルツ波の入射角 θ が 0 でないことによって、試料水溶液中をテラヘルツ波が進む距離は $(\cos \theta)^{-1}$ 倍になる。この距離は $\theta = 1^\circ$ のとき 0.015 %、 $\theta = 3^\circ$ のとき 0.14 % 大きくなる。本光学系における試料セルへの入射角は $\theta = 1^\circ$ 程度であると推測する。これによる吸収の誤差は 0.02 % 程度と見積もった。この誤差は、厚さに由来する誤差に対して十分小さいので、無視できると考えられる。レーザービーム強度の時間変化による誤差は、時間と共に強度が揺らぐことと時間と共にレーザー強度が低下することの 2 つにより生じると考えられる。強度の揺らぎは、ランダム誤差に影響すると考えられる。強度の低下は、時間と共に常に一定の割合で起こるわけではないのでランダム誤差としての性質も持つと考えられるが、系統誤差としての性質が強いと考えられる。以下では、レーザー強度の時間変化をフォトダイオードでモニターし、そのデータを用いて時間波形の補正を行ったことについて述べる。

測定したテラヘルツ波の電場の時間波形 E_{THz} を図 2.15(b) に、測定時のレーザー強度 I を図 2.15(a) に示す。測定したレーザー強度には、ノイズがのっている。ノイズの影響を小さくするために、Origin[®] の隣接平均機能によりレーザー強度のスムージングを行った。隣接平均法では、 m_0 個のデータからなるレーザー強度のデータにおいて、 i 番目の測定値とそれに隣接するの測定

データ(合わせて m 個)の平均値をとって i 番目のレーザー強度とする。ただし、 m が奇数のときは区間 $[i - (m - 1)/2, i + (m - 1)/2]$ 、 m が偶数のときは区間 $[i - m/2 + 1, i + m/2]$ の測定データの平均値を計算する。本研究では、 $m = 500$ とした。隣接平均をとることによりスムージングを行った後の I は、図 2.15(a) に赤線で示すようになった。

レーザー強度と検出されるテラヘルツ電場の信号は 2 乗に比例することが理論的に予想される。これは次のように導ける。発生する電場 E_{THz} と結晶内部の分極の関係 \mathbf{P} は、

$$E_{\text{THz}} \propto \frac{\partial^2 \mathbf{P}}{\partial t^2} \quad (2.46)$$

であり、光整流の場合、 E_{THz} とレーザー強度 I との関係は、

$$E_{\text{THz}} \propto \frac{\partial^2 P^{(2)}}{\partial t^2} = \frac{\partial^2}{\partial t^2} (\chi^{(2)} E^2) \propto \frac{\partial^2}{\partial t^2} (\chi^{(2)} I) \propto I \quad (2.47)$$

となる。また、フォトデューバー効果を考える場合でも、 E_{THz} と I は比例すると考えられる。バランス検出器の信号は、レーザー強度 I とテラヘルツ波電場 E_{THz} の積に比例する。検出されるテラヘルツ電場はすなわち I^2 に比例すると考えられる。テラヘルツ波の振幅をレーザー強度の 2 乗で割ることで補正した。

図 2.16 に 10 回連続して測定したテラヘルツ波の時間波形のピーク位置における電場とそれをピーク位置におけるレーザー強度 I の 1 乗、1.5 乗、2 乗で割った結果である。レーザー強度を補正しない場合、測定回数を重ねるごとにテラヘルツ電場は小さくなったが、レーザー強度による補正をかけることで電場の大きさは一定値に近づいた。レーザー強度の 1.5 乗で補正をしたときが、最も電場の大きさが一定値に近づいた。検出されるテラヘルツ電場がレーザー強度の何乗に比例するかを調べるために、テラヘルツ波のピークにおける電場の時間変化とそのときのレーザー強度の時間変化を同時に測定した。この実験では、遅延ステージをテラヘルツ波のピーク位置で固定し、この状態で、テラヘルツ波のピーク電場の時間変化とレーザー強度の時間変化を測定した。ピーク電場の時間変化を図 2.17(a) に、レーザー強度の時間変化を図 2.17(b) に示す。測定データにはノイズが含まれることから、それぞれのデータを隣接平均法によりスムージングを行った。スムージングを行った後のピーク電場とレーザー強度を両対数プロットしたものを図 2.18 に示す。レーザー強度に対するピーク電場の変化を両対数プロットしたものを直線フィットした結果、 $\log_{10} E_{\text{THz}} = 1.76 \log_{10} I - 0.765$ という結果が得られた。この結果は、検出されるテラヘルツ電場

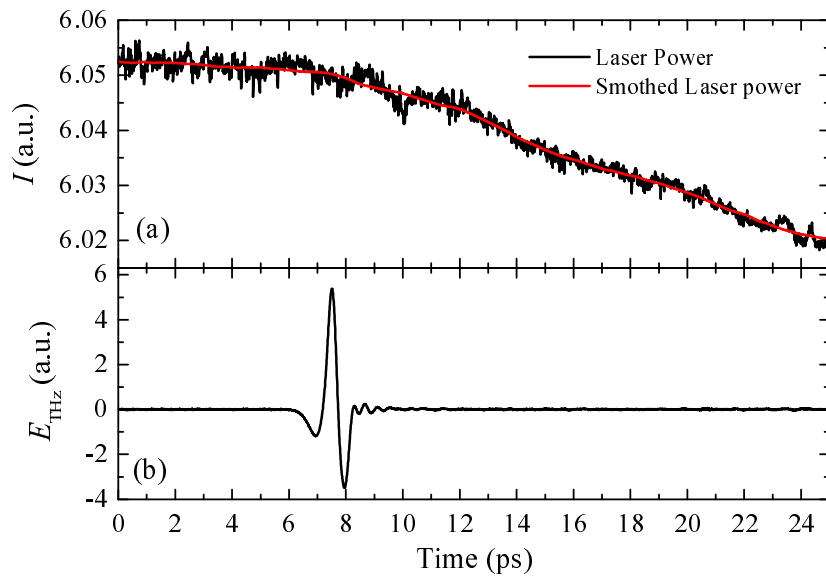


図 2.15. (a) レーザー強度のスムージング、(b) 同時に測定した時間波形の例

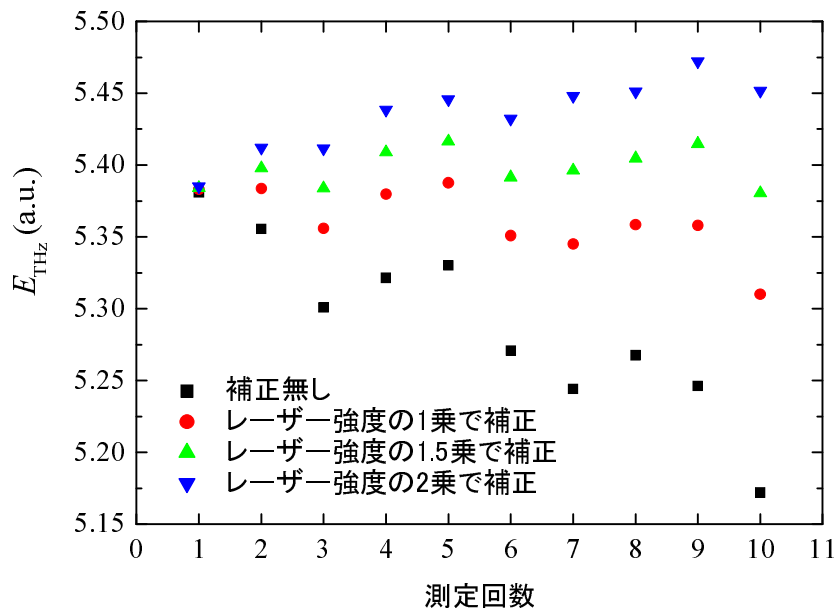


図 2.16. 10 回連続で測定した時間波形のピークにおける電場 (■) とそれをピーク位置におけるレーザー強度の 1 乗 (●)、1.5 乗 (▲)、2 乗 (▼) で割った結果

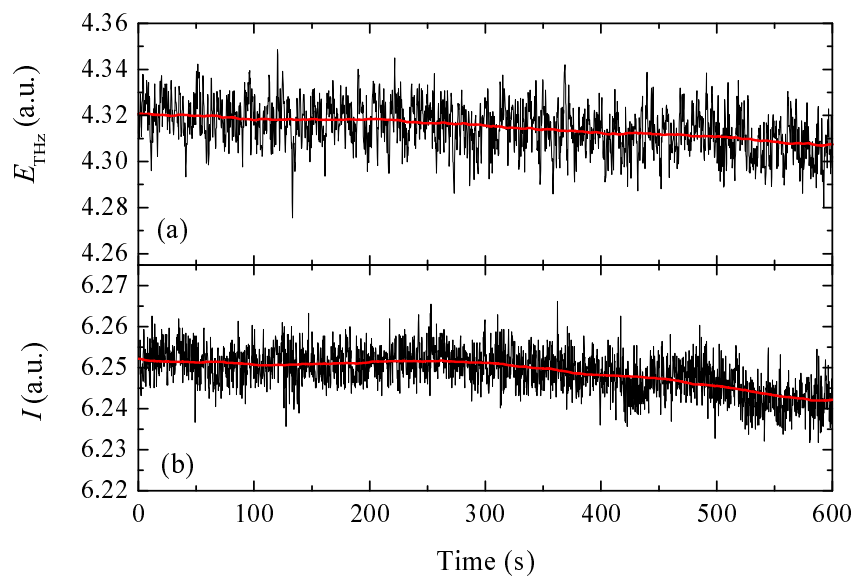


図 2.17. (a) テラヘルツ波のピークにおける電場 E_{THz} の時間変化と (b) 同時に測定したレーザー強度 I の時間変化。(黒：測定結果、赤：500 回隣接平均) ピークにおける E_{THz} の時間変化は、遅延ステージをテラヘルツ波のピーク位置で固定し、ロックインアンプの出力信号を 600 s 間測定した。

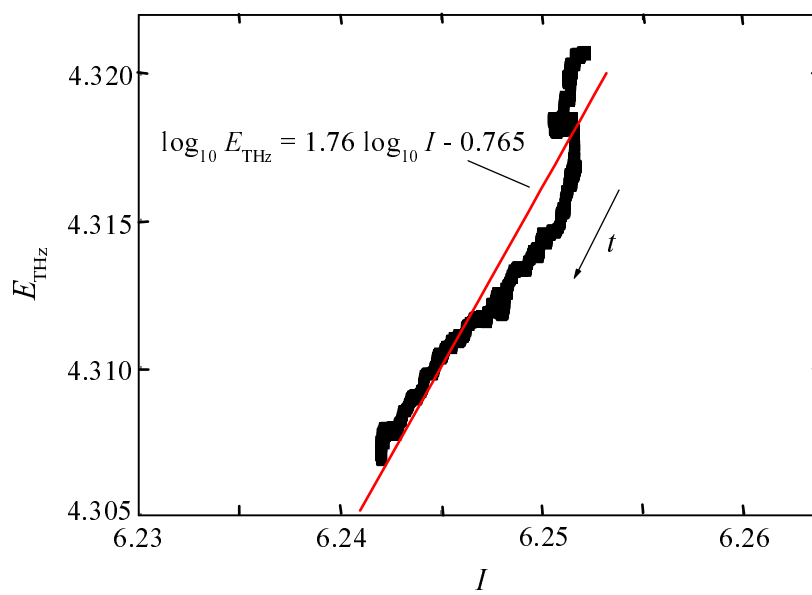


図 2.18. 図 2.17 で示したテラヘルツ波のピークにおける電場 E_{THz} とそのときのレーザー強度 I の両対数プロット。(黒：実測値、赤：フィッティング結果) ピーク電場とレーザー強度には 500 回隣接平均後の結果を用いている。

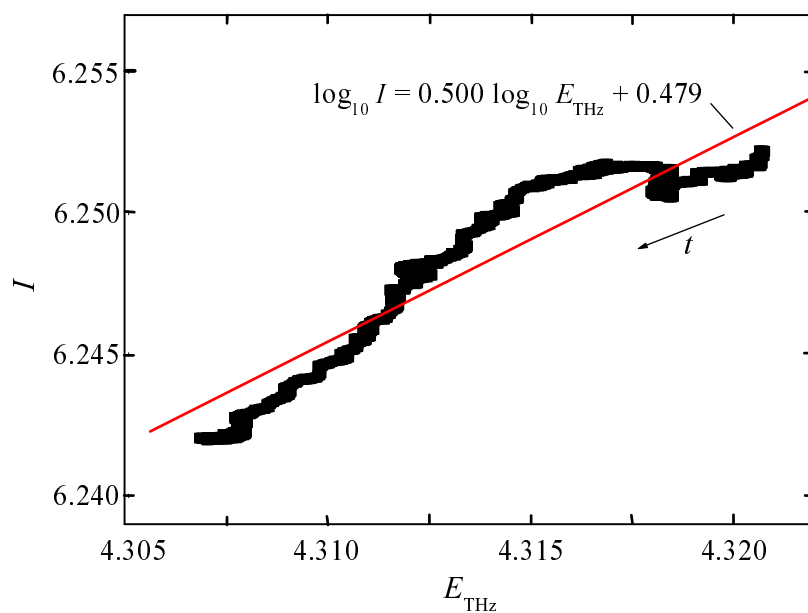


図 2.19. 図 2.18 の x 軸と y 軸を交換して行ったフィッティング (黒 : 実測値、赤 : フィッティング結果)。ピーク電場とレーザー強度には図 2.17 で示した 500 回隣接平均後の結果を用いている。

がレーザー強度の 1.76 乗に比例することを示している。さらに、両対数プロットの x 軸と y 軸を交換した場合を図 2.19 に示す。直線フィッティングを行うと、 $\log_{10} I = 0.500 \log_{10} E_{\text{THz}} + 0.479$ という結果が得られた。この結果は、検出されるテラヘルズ電場がレーザー強度のちょうど 2 乗に比例することを示している。これらの両対数プロットでは、測定した I の範囲が狭く、測定データが完全にフィッティング直線にのっているとは言いがたい。しかしながら、この結果から、大雑把に言えば、検出されるテラヘルズ電場はレーザー強度の 1.5 乗よりも 2 乗に比例すると考えられる。このことから、本研究では、理論どおりに 2 乗で補正する方法を採用した。

本研究では、測定精度の向上のために、レーザー強度による補正に加えて、スペクトルの積算を行った。 N 回積算を行う事により、ランダムな測定誤差は $\frac{1}{\sqrt{N}}$ となる。 N 回スペクトルを積算するときの測定データの解析手順を図 2.20 と図 2.21 に示す。はじめに、参照 (テラヘルズ) 波 $E_{\text{ref}}^i(t)$ と試料を透過したテラヘルズ波 $E_{\text{sam}}^i(t)$ を N 回ずつ交互に測定した (図 2.20)。 $E_{\text{ref}}^i(t)$ の測定と同時にレーザー強度 $I_{\text{ref}}^i(t)$ を、 $E_{\text{sam}}^i(t)$ の測定と同時に $I_{\text{sam}}^i(t)$ をそれぞれ測定した。 $I_{\text{ref}}^i(t)$ と $I_{\text{sam}}^i(t)$ は全て上で述べたように 500 個のデータで隣接平均をとってスムージングを行った。スムージング後のレーザー強度 $\bar{I}_{\text{ref}}^i(t)$ と $\bar{I}_{\text{sam}}^i(t)$ は、一連の測定を開始したときのレーザー強度 $\bar{I}_{\text{ref}}^1(t=0)$ で規格化をした。測定したテラヘルズ電場 $E_{\text{ref,sam}}^i(t)$ を、規格化したレーザー強度の 2 乗 $\left(\frac{\bar{I}_{\text{ref,sam}}^i(t)}{\bar{I}_{\text{ref}}^1(0)}\right)^2$ で割ることで、レーザー強度の時間変化の影響を補正した。補正をした N 個の参照波の時間波形を平均し、平均後の波形のピーク位置から参照波にかける窓関数の中心を決定した。同様に、補正をした N 個の試料透過波の時間波形を平均し、その波形のピーク位置から試料透過波にかける窓関数の中心を決定した。参照波にかける窓関数 $w_{\text{ref}}(t)$ は、平均後の時間波形にかけるのではなく、平均前の波形にそれぞれかけた。同様に、試料透過波にかける窓関数 $w_{\text{sam}}(t)$ も、平均前の波形にそれぞれかけた。窓関数をかけた全ての波形に対してそれぞれ FFT を行い、 $\tilde{E}_{\text{ref}}^i(\omega)$ と $\tilde{E}_{\text{sam}}^i(\omega)$ を得た。これらの比をとり、式 (2.20) または (2.36) を用いて $t^i(\omega)$ と $\Delta\phi^i(\omega)$ を計算した。 N 個の $t^i(\omega)$ の平均をとって $t^{\text{ave}}(\omega)$ を、 N 個の $\Delta\phi^i(\omega)$ の平均をとって $\Delta\phi^{\text{ave}}(\omega)$ を得た。

ここで例として、石英基板に対して 10 回積算を行って得られた $t^{\text{ave}}(\omega)$ と $\Delta\phi^{\text{ave}}(\omega)$ を図 2.22 に示す。参照波は、図 2.13 に示すような方法で測定した。レーザー強度による補正をしたときとしていないときの $\Delta\phi^{\text{ave}}(\omega)$ の差を図 2.23(a) に、 $t^{\text{ave}}(\omega)$ の差を図 2.24(a) に示す。低周波側ほど補正による値の変化が大きいことが分かる。10 回の測定により得られた位相差の標準偏差を図 2.23(b) に、振幅比の標準偏差を図 2.24(b) に示す。標準偏差は、測定値の分布が正規分布に従うという仮定の下で、全測定データの 68 % が測定値の平均値から標準偏差の範囲内に含まれることを意味し

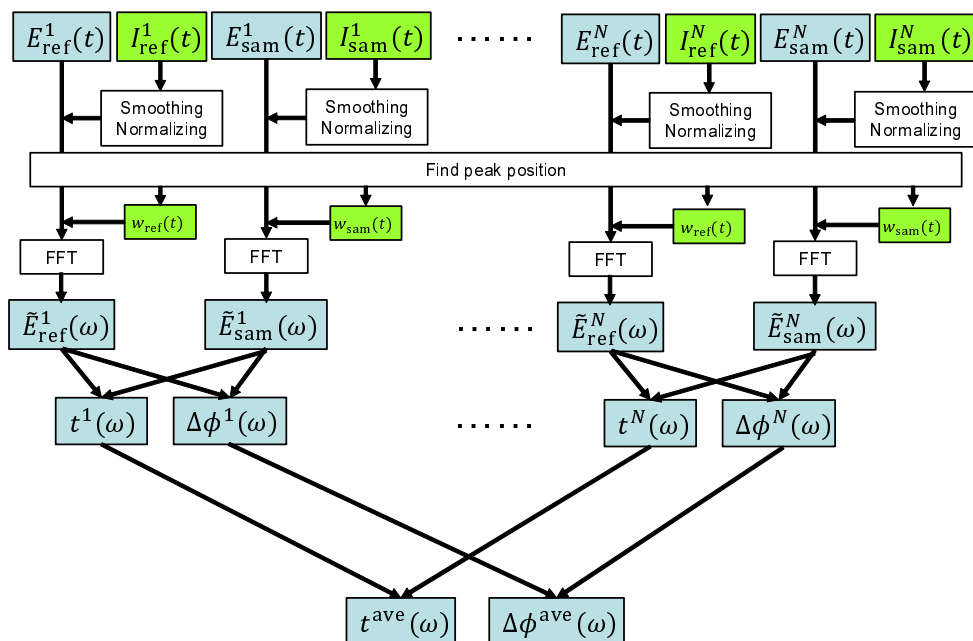


図 2.20. 測定データの積算までの解析手順

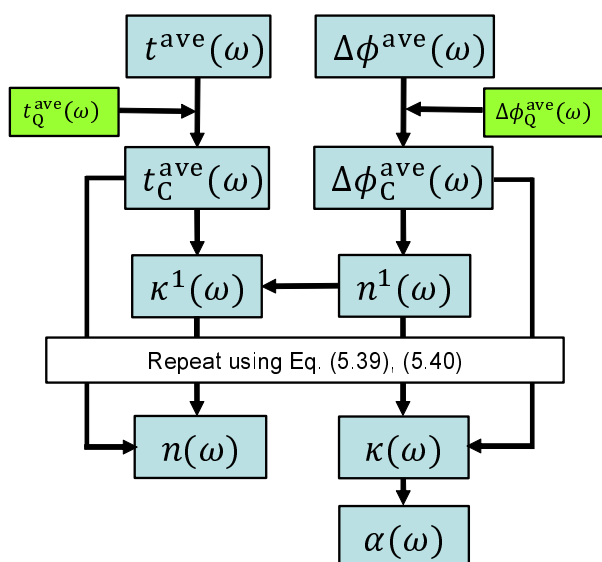


図 2.21. 積算から試料の光学定数を得るまでのデータの解析手順

ており、本研究ではこれを1回測定に対するランダム誤差として扱う。位相差の標準偏差は、レーザー強度による補正の有無によらずほとんど変わらない。この結果は、位相差がレーザー強度の時間変化の影響をほとんど受けないことを示している。このことは、位相差が空気と試料との屈折率実部の差、すなわち、空気中と試料中でのテラヘルズ波の位相速度の違い、あるいは、空気中と試料中でのテラヘルズ波の波長の違いを反映することからも、妥当な結果であると考えられる。一方、振幅比の標準偏差は、レーザー強度を補正したほうが補正をしないときよりも小さくなった。この結果は、レーザー強度の時間変化がテラヘルズ波の振幅とそこから導かれる振幅比に影響を与えることを示しており、上で述べた補正の方法がレーザー強度の時間変化の影響を取り除くために有効であることを示していると考えられる。また、レーザー強度の時間変化を補正することで、吸収係数のランダム誤差を低減できたといえる。石英基板の複素屈折率は、2.2.4節で述べたように、式(2.25)、(2.26)により大体の値を求め、式(2.23)、(2.24)を繰り返し適用することで求めることができる。石英基板の吸収係数 α は、式(2.27)により κ から求めることができる。レーザー強度による補正を行った場合の石英基板の屈折率 n と吸収係数 α を図2.25(a)に、補正を行った場合と行わなかった場合で得られる n および α の違いを図2.25(b)に示す。 n は、積算によってほとんど変化しないのに対し、 α は積算後のほうが積算前よりも小さくなった。本研究で用いたレーザーのビーム強度は、時間の経過と共に弱まる傾向にあった。本研究では、参照波を測定した後に試料透過波を測定した。この場合、レーザービーム強度が弱まることによって、試料透過波の振幅が本来よりもより小さく測定される。従って、 α は本来よりも大きく測定される。ビーム強度の補正によって過大に評価された α が本来の値に近づいたと考えられ、妥当な結果であると考えられ、レーザー強度の低下に起因する吸収係数の系統誤差を低減できたといえる。以上から、レーザー強度の時間変化の影響を補正することで、ランダム誤差と系統誤差の両方において測定精度が向上するといえる。

もうひとつの測定例として、純水の測定を示す。参照波は、図2.14に示すような方法で測定した。試料セルの厚さ d は、0.1 mmである。試料セルを構成する石英基板は上で述べた複素屈折率の測定で用いたものと同じの基板であり、石英基板の n と α は図2.25に示す値を用いた。図2.20において $t^{\text{ave}}(\omega)$ と $\Delta\phi^{\text{ave}}(\omega)$ を得るまでの手順は、石英基板の測定と同一である。得られた純水の $\Delta\phi^{\text{ave}}(\omega)$ と $t^{\text{ave}}(\omega)$ を図2.26(a)に示す。得られた純水の $\Delta\phi^{\text{ave}}(\omega)$ と $t^{\text{ave}}(\omega)$ から純水の n と α を求める手順を図2.21に示す。2.2.6節で述べたように、参照用基板と試料用基板の厚さが完全に同一であることはない。基板の厚さの違いにより、参照波に対する光路長と試料透過波に対す

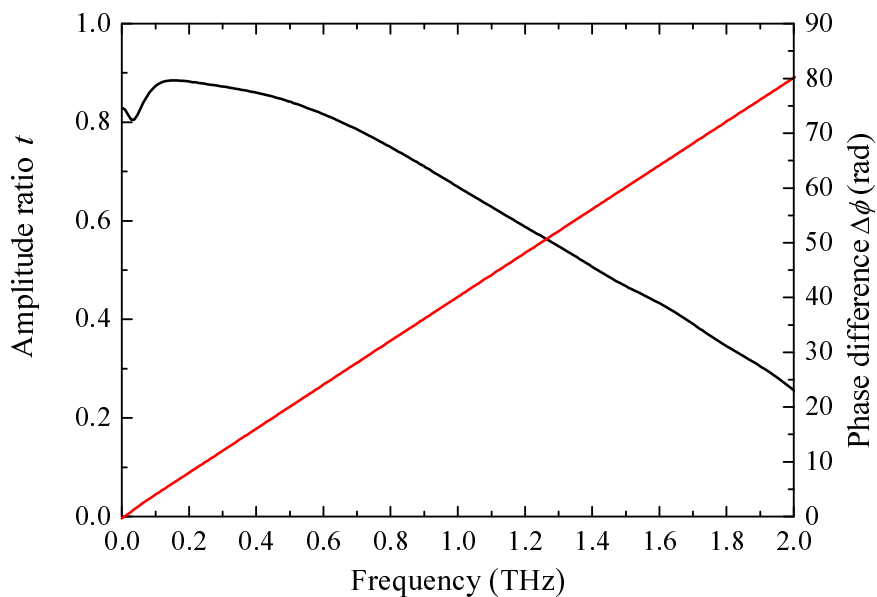


図 2.22. 10 回積算後の石英基板の振幅比と位相差

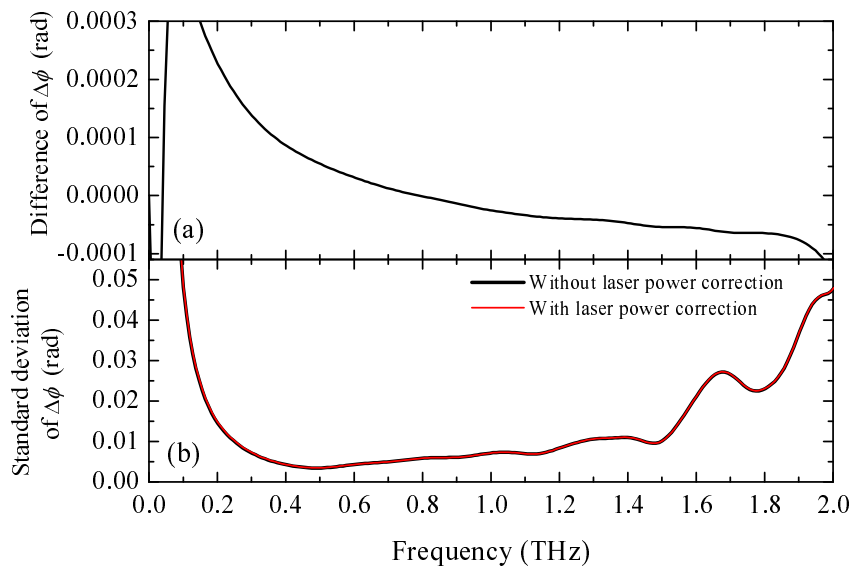


図 2.23. (a) レーザー強度を補正したときとしないときの石英基板の位相差の差、(b)10 回積算したときのレーザー強度を補正したときとしないときの石英基板の位相差の標準偏差

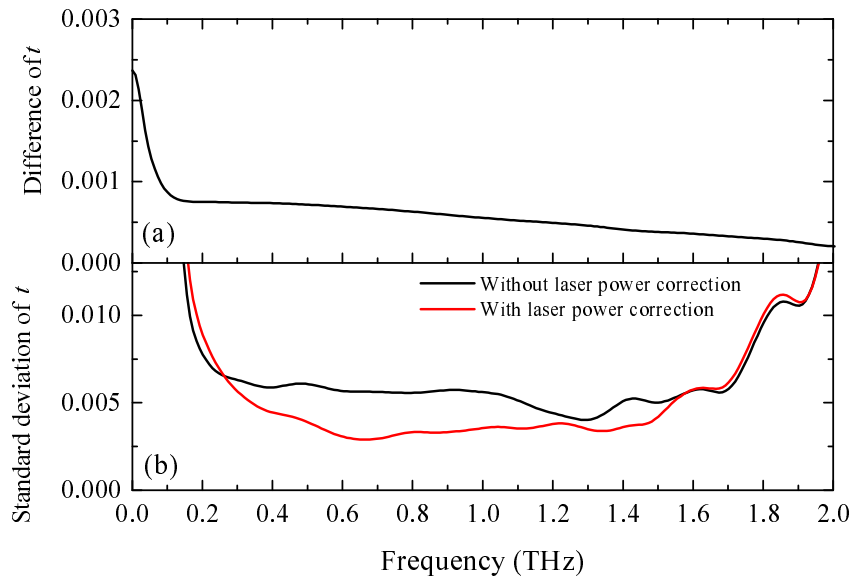


図 2.24. (a) レーザー強度を補正したときとしないときの石英基板の振幅比の差、(b)10 回積算したときのレーザー強度を補正したときとしないときの石英基板の振幅比の標準偏差

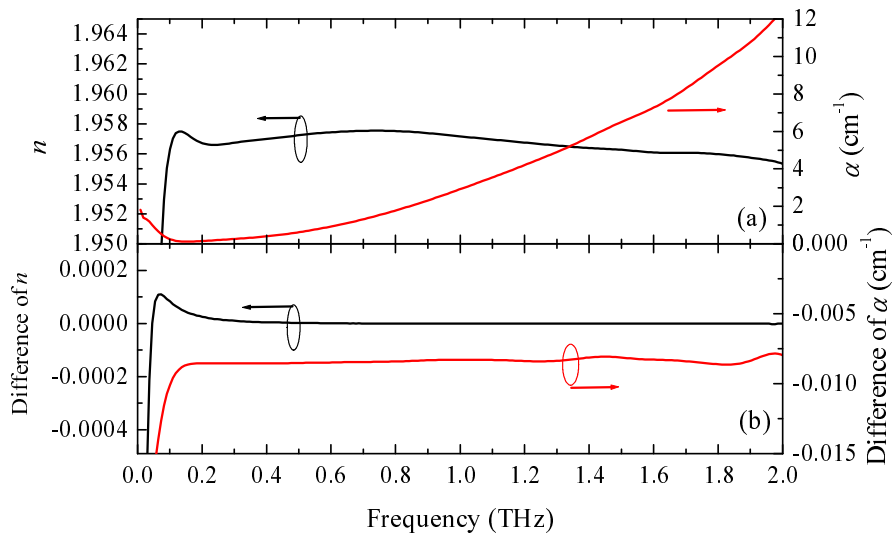


図 2.25. (a) 石英基板の屈折率と吸収係数、(b) レーザー強度を補正したときと補正していないときの屈折率および吸収係数の差

る光路長に違いが生じる。光路長の違いは基板による位相の遅れに違いを生じさせる。そのため、得られた $t^{\text{ave}}(\omega)$ と $\Delta\phi^{\text{ave}}(\omega)$ は、純水による振幅や位相の変化だけでなく、参照用基板と試料セル用基板の厚さの違いの影響も含まれる。図 2.14(b) に示す方法で測定した、参照用と試料セル用基板を透過したテラヘルツ波の振幅比 $t_{\text{Q}}^{\text{ave}}(\omega)$ と位相差 $\Delta\phi_{\text{Q}}^{\text{ave}}(\omega)$ を図 2.26(b) に示す。 $t_{\text{Q}}^{\text{ave}}(\omega)$ と $\Delta\phi_{\text{Q}}^{\text{ave}}(\omega)$ は、図 2.20 に示す手順に従って、それぞれの基板を透過したテラヘルツ波の波形 $\tilde{E}_{\text{ref}}(\omega)$ と $\tilde{E}_{\text{sam}}(\omega)$ を交互に 10 回測定して求めた 10 個の振幅比と位相差の平均をそれぞれとって算出した。式 (2.36) の左辺を計算するために $t^{\text{ave}}(\omega)$ を $t_{\text{Q}}^{\text{ave}}(\omega)$ で割り、右辺と比較することで純水の振幅比 $t_{\text{C}}^{\text{ave}}(\omega)$ を、 $\Delta\phi^{\text{ave}}(\omega)$ から $\Delta\phi_{\text{Q}}^{\text{ave}}(\omega)$ を差し引いて右辺と比較することで $\Delta\phi_{\text{C}}^{\text{ave}}(\omega)$ を算出できる。得られた $t_{\text{C}}^{\text{ave}}(\omega)$ と $\Delta\phi_{\text{C}}^{\text{ave}}(\omega)$ を図 2.27 に示す。1 THz における純水の $t^{\text{ave}}(\omega)$ は、試料の厚さが 0.1 mm であっても 0.3 程度であり、テラヘルツ波のエネルギー透過率にすると 10% 程度である。レーザー強度による補正をしたときとしていないときの $\Delta\phi_{\text{C}}^{\text{ave}}(\omega)$ の差を図 2.28(a) に、 $t_{\text{C}}^{\text{ave}}(\omega)$ の差を図 2.29(a) に示す。石英基板の測定のとおり同様に、低周波側ほど補正による変化が大きい。10 回の測定により得られた位相差の標準偏差を図 2.28(b) に、振幅比の標準偏差を図 2.29(b) に示す。位相差の標準偏差は、レーザー強度による補正の有無に関わらずほとんど変わらなかった。それに対して、振幅比の標準偏差は、レーザー強度の補正をしたときのほうが補正をしないときよりも小さくなった。この結果も石英基板の測定のとおり同様の傾向であり、レーザー強度の時間変化を補正することで吸収係数のランダム誤差を低減できたといえる。2.2.6 節に示すように、得られた $\Delta\phi_{\text{C}}^{\text{ave}}(\omega)$ と $t_{\text{C}}^{\text{ave}}(\omega)$ の値から、式 (2.41) と (2.42) によって大体の n と κ の値を計算し、式 (2.39) と (2.40) を繰り返し用いることで純水の n と κ が得られる。純水の吸収係数 α は、式 (2.27) を用いることで計算できる。得られた純水の n と α を図 2.30(a) に示す。純水の n は、振動数の増加と共に減少し、 α は増加した。純水の α は、図 2.25(a) に示す石英基板の α と比べてきわめて大きいことが分かる。1 THz における純水の α は 230 cm^{-1} であった。この値は Afser らによって報告された 1 THz における α の値 [49] とよく一致している。レーザー強度による補正を行ったときと行わなかったときの n と α の差をそれぞれ図 2.30(b) に示す。レーザー強度の補正の有無による純水の n の違いは n に対して十分小さいが、 α は強度補正をしたほうがしない場合よりも 1 cm^{-1} 程度小さかった。これは、石英基板の測定でも述べたように、レーザー強度が時間と共に低下する傾向にあることが原因であると考えられ、これによる吸収係数の系統誤差を 1 cm^{-1} 程度低減できたといえる。ここで示した純水の測定の結果から、石英基板の場合と同様に、レーザー強度による補正により、ランダム誤差と系統誤差の両方において測定の精度が向上

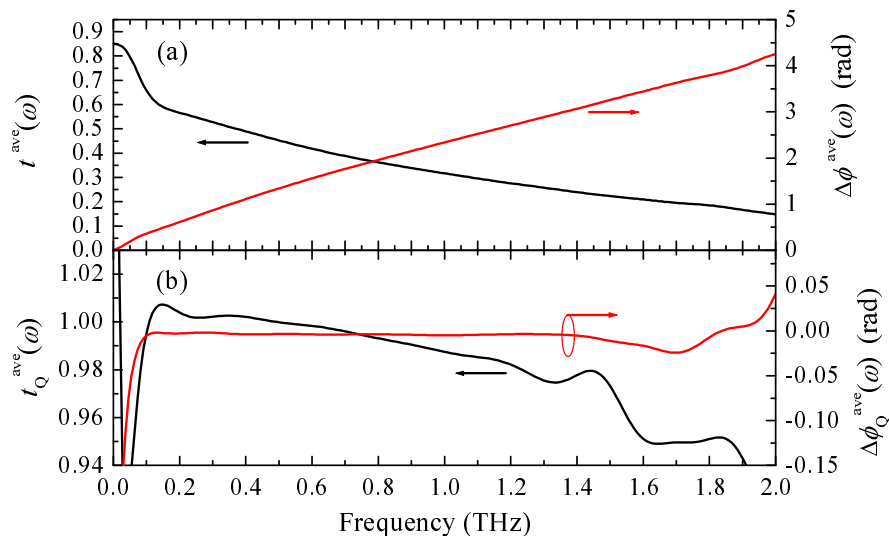


図 2.26. (a)10 回積算後の純水の振幅比と位相差、(b) 参照用基板と試料セルの基板の振幅比と位相差

したといえる。

屈折率 n のランダム誤差 δn は、式 (2.41) から、

$$\delta n(\omega) = \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{c}{2\pi\nu d} \delta(\Delta\phi_C^{ave}(\omega)) \quad (2.48)$$

とかける。誤差 $\delta(\Delta\phi_C^{ave}(\omega))$ には、 $\Delta\phi_C^{ave}(\omega)$ の標準偏差の値を用いた。 N は積算の回数である。得られる $\delta n(\omega)$ を図 2.31 に示す。 n の値は 2.1 程度であるのに対して、 δn は 0.001 程度であるので、 n のランダム誤差は 0.05 % 程度であるといえる。 $t_C^{ave}(\omega)$ のランダム誤差 (標準偏差) と α のランダム誤差との関係は、式 (2.43) から

$$\delta\alpha(\omega) = \frac{\partial\alpha}{\partial t_C} \delta t_C(\omega) = -\frac{1}{\sqrt{N}} \frac{2}{d} \frac{1}{t_C(\omega)} \delta t_C(\omega) \quad (2.49)$$

と導ける。式 (2.41) で導いた n のランダム誤差は α にも影響する。 n のランダム誤差に由来する α のランダム誤差は、

$$\delta\alpha(\omega) = \frac{\partial\alpha}{\partial n} \delta n = \frac{2}{d} \left\{ \frac{1}{n(\omega)} - \frac{2(n_1(\omega) + n(\omega))}{(n_1(\omega) + n(\omega))^2 + \kappa_1^2(\omega)} \right\} \delta n(\omega) \quad (2.50)$$

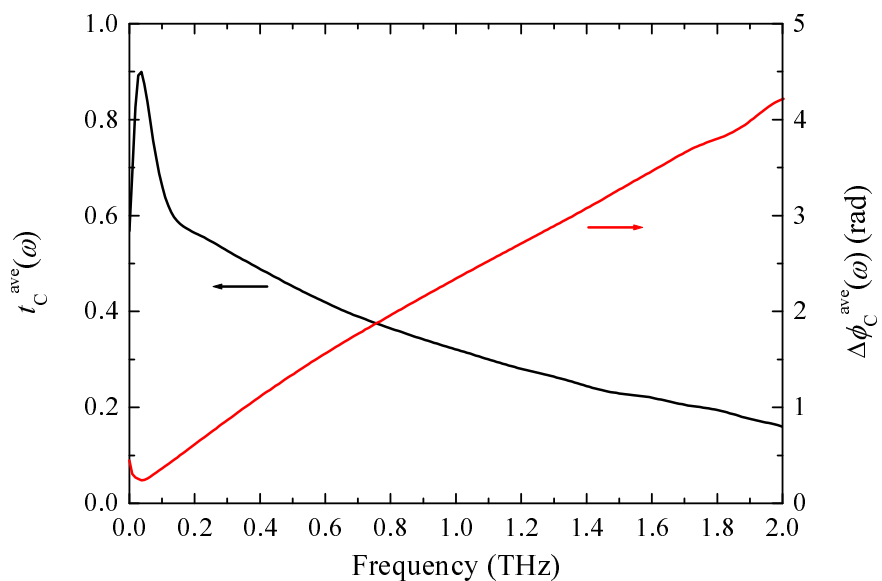


図 2.27. 基板の厚さの違いを補正したあとの 10 回積算後の純水の振幅比と位相差

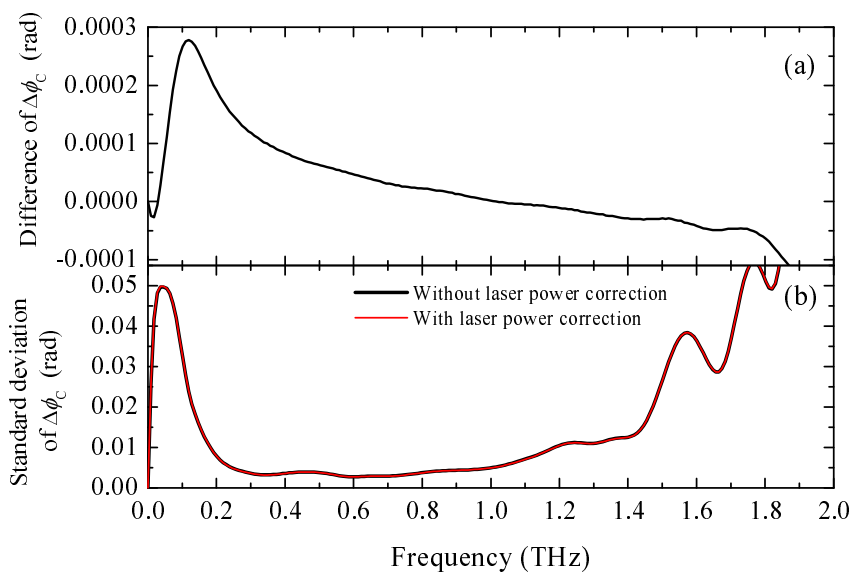


図 2.28. (a) レーザー強度を補正したときとしないときの位相差の差、(b)10 回積算したときのレーザー強度を補正したときとしないときの位相差の標準偏差

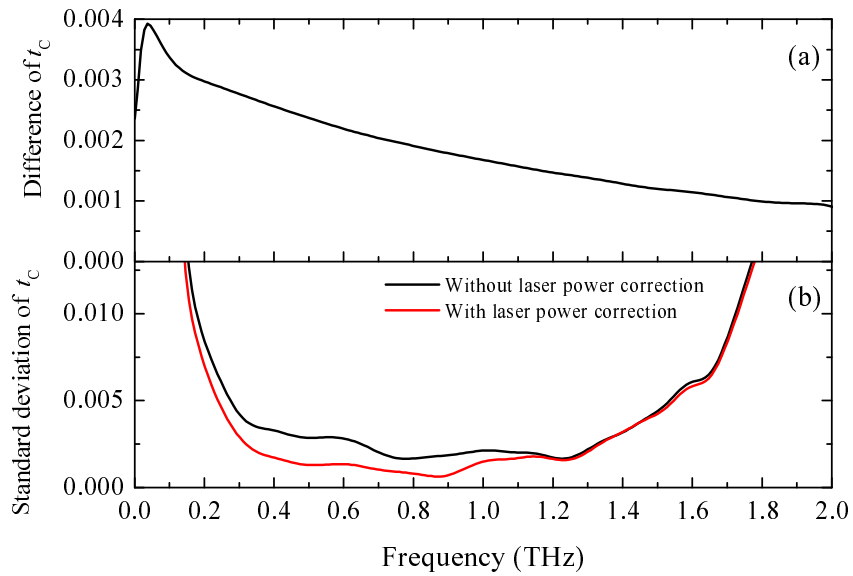


図 2.29. (a) レーザー強度を補正したときとしないときの振幅比の差、(b)10回積算したときのレーザー強度を補正したときとしないときの振幅比の標準偏差

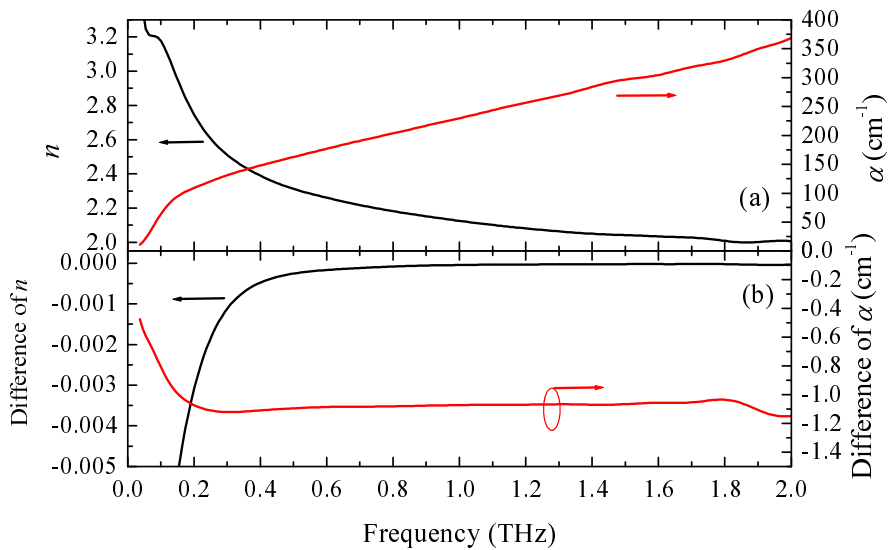


図 2.30. (a) 純水の屈折率と吸収係数、(b) レーザー強度を補正したときと補正していないときの屈折率および吸収係数の差

とかける。ただし、 n_1 と κ_1 はそれぞれ石英基板の複素屈折率 \tilde{n}_1 の実部と虚部である。式 (2.49) と式 (2.50) から、総合的な α のランダム誤差は

$$\delta\alpha(\omega) = \sqrt{\left(\frac{\partial\alpha}{\partial t_C}\delta t_C\right)^2 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial n}\delta n\right)^2} \quad (2.51)$$

により計算できる。式 (2.49)、(2.50)、(2.51) により得られる $\delta\alpha$ を図 2.32 に示す。 t_C のランダム誤差に由来する α のランダム誤差と、 n のランダム誤差に由来する α のランダム誤差を比較すると、後者のほうが小さいことがわかる。従って、 α のランダム誤差は、ほとんど t のランダム誤差に由来することが分かる。特に α のランダム誤差が 0.5 cm^{-1} 以下となる周波数領域は、0.26 - 1.3 THz であった。図 2.33 に $t_C^{\text{ave}}(\omega)$ に対するそのランダム誤差の割合を示す。ランダム誤差は、0.2 - 1.3 THz で 1 % 以下であることが分かる。ランダム誤差 1 % は、 $N = 10$ 、 $d = 0.1 \text{ mm}$ の場合について式 (2.49) を用いて α のランダム誤差に変換すると、振動数によらず、 $\delta\alpha = 0.6 \text{ cm}^{-1}$ となる。 $t_C^{\text{ave}}(\omega)$ のランダム誤差は、 $t_C^{\text{ave}}(\omega)$ に対して 1 % であった。一般的なテラヘルツ分光装置の誤差は 3 % 程度であるのに対して、この装置と手法を用いることにより、1 THz において 0.3 % (純水の吸収係数 230 cm^{-1} に対してランダム誤差 0.6 cm^{-1}) の精度を実現したといえる。また、レーザー強度の時間変化に由来する系統誤差についても、純水測定時に、補正によって 1 cm^{-1} 程度低減したといえる。3 章で述べる測定結果は、ここで述べたのと同様の手法、および手順で測定した。

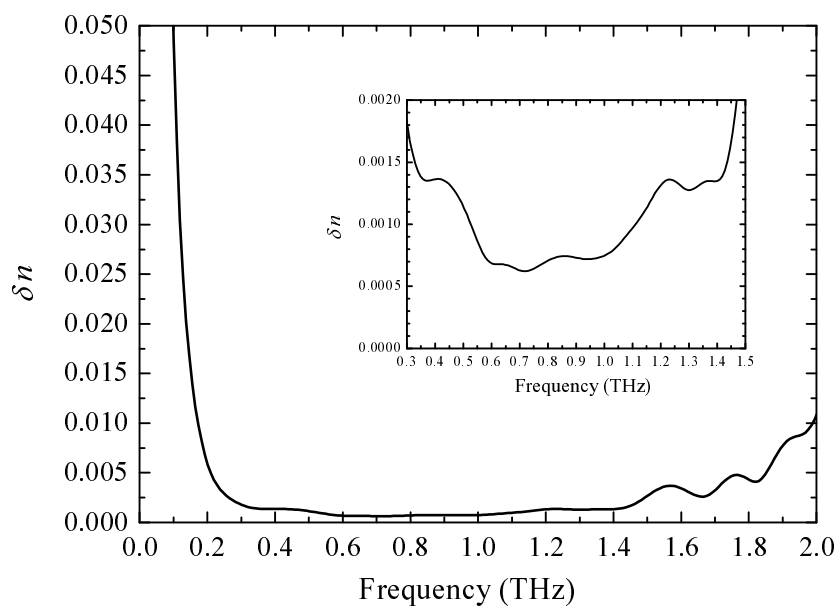


図 2.31. 純水の屈折率のランダム誤差、挿入図は 0.3-1.3 THz の拡大図

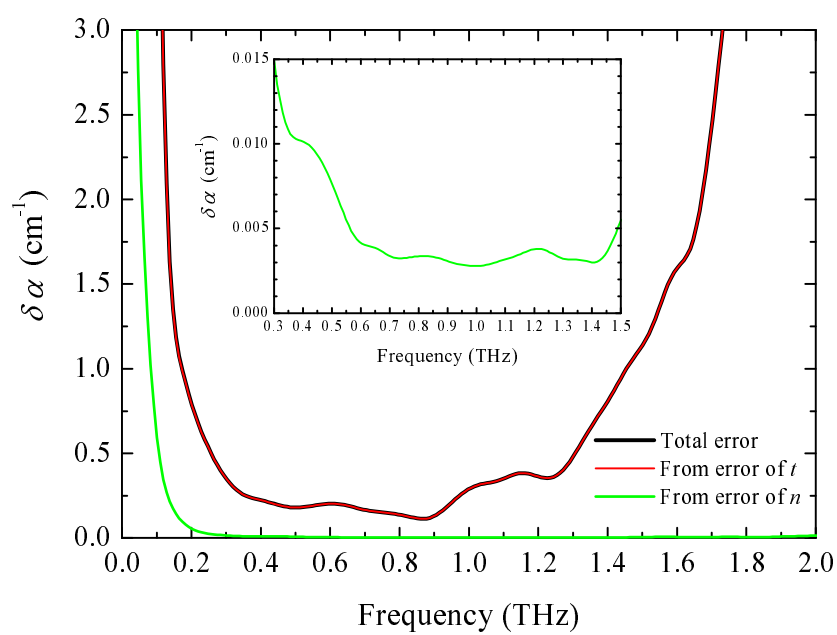


図 2.32. 純水の吸収係数のランダム誤差、挿入図は基板の屈折率のランダム誤差に由来する吸収係数のランダム誤差の拡大図

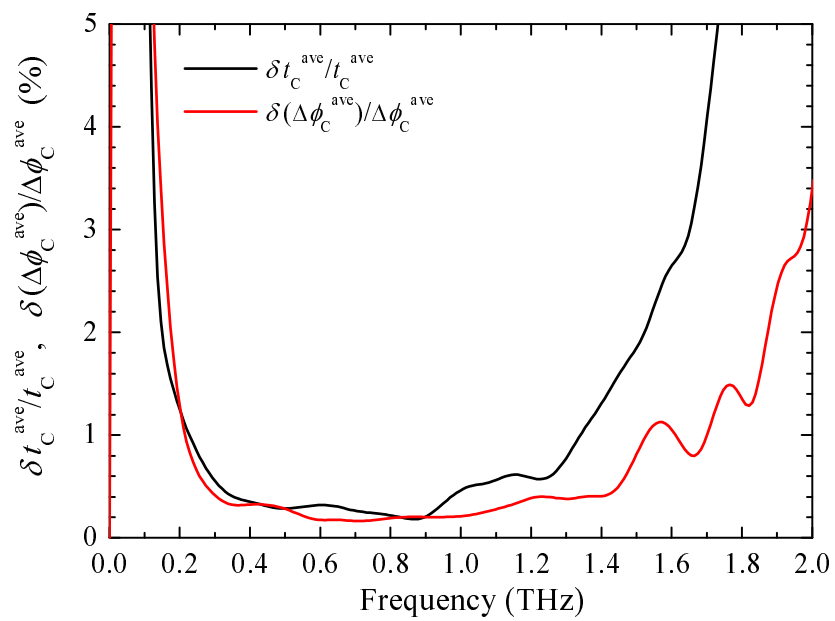


図 2.33. 純水の t と $\Delta\phi$ に対するそれらのランダム誤差の割合 (誤差率)

第3章 実験結果

3.1 リゾチームの水和とその解析

測定した純水と 200 mg/mL (14 mmol/L) リゾチーム水溶液の屈折率 n と吸収係数 α のスペクトルを図 3.1 に示す。ここで示すスペクトルは、純水もリゾチーム水溶液も、それぞれ、試料水溶液の作成から 2.2.7 節に示す一連の測定 (10 回積算) までを 3 回繰り返して、得られた n と α を平均したものである。純水においてもリゾチーム水溶液においても、 n はテラヘルツ波の振動数の増加と共に単調に減少し、 α は振動数の増加と共に単調に増加した。 n も α も、測定した振動数領域において、リゾチーム水溶液のほうが純水よりも小さかった。得られたスペクトルはすべて、特徴的なピークを持たないスペクトルであった。特徴的なピークを持たないスペクトルから水和について議論するために、本研究では吸収係数の大きさによる議論を行う。リゾチーム水溶液の α が純水よりも小さいことは、(1) リゾチーム水溶液中に含まれる水の量が減っていること、(2) リゾチームの周囲の水分子が水和によりバルク水よりも動きにくくなっていること、によると考えられる [95–98]。水の動きが遅くなることでテラヘルツ帯の吸収が小さくなることは、次のように考えることで理解できる。本研究で観測している周波数領域の吸収は、図 1.4 に示すように、主に水分子の配向緩和 (τ_1 成分) によるものである。水分子の動きが遅くなることで、配向緩和のピークは低振動数側にシフトし、テラヘルツ帯の吸収は小さくなると考えられる。(逆に水分子の動きが速くなると、配向緩和のピークは高振動数側にシフトし、テラヘルツ帯の吸収は大きくなると考えられる。) また、Havenith らの研究グループは、MD シミュレーションにより水素結合ネットワークのダイナミクスとテラヘルツ帯の水の吸収との関係を調べており、水素結合の寿命が延びて水の動きが遅くなると 2 THz 以下で吸収が小さくなることを報告している [22]。

N. Q. Vinh ら [95] は、テラヘルツ分光により、水溶液中のリゾチームの水和を調べている。彼らは、リゾチーム水溶液の吸収係数から水の吸収係数を差し引くことにより、差スペクトル $\Delta\alpha(\omega)$ を調べている。この $\Delta\alpha(\omega)$ を求める際、リゾチーム水溶液中に含まれる水の量を考慮している。その結果、差スペクトルは負になると報告している。この差スペクトルは、リゾチームと水から

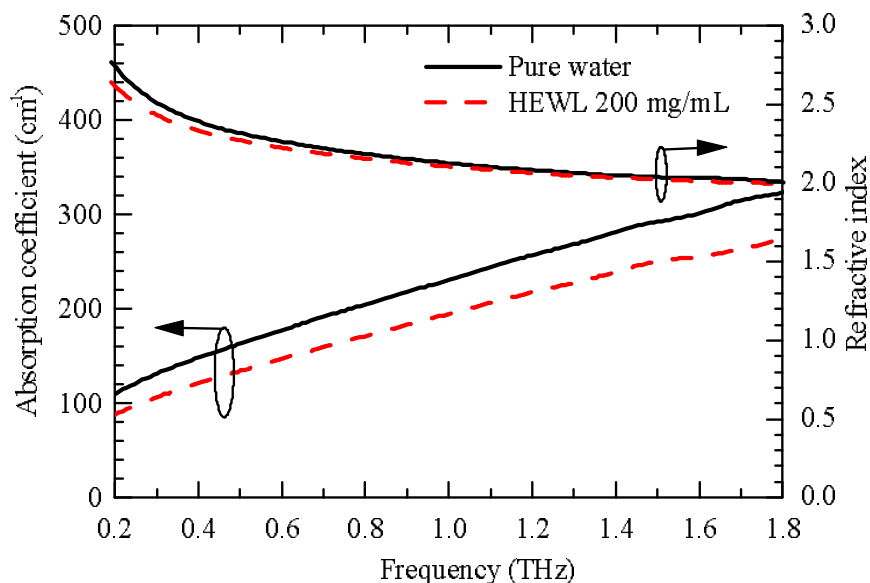


図 3.1. 純水 (黒) およびリゾチーム 200 mg/mL 水溶液 (赤) の吸収係数 α と屈折率 n のスペクトル。測定誤差は、線の太さよりも小さい。

なる系の吸収から水の吸収を差し引いているので、リゾチームの吸収スペクトルであるが、この差スペクトルには、リゾチームの吸収に加え、水分子がリゾチームの影響を受ける事でバルク状態とは異なる状態になる事による吸収係数の変化の影響が含まれている (後で述べる式 (3.4) を参照)。負の差スペクトルは、リゾチームの水和によって、水和水のダイナミクスがバルク水のダイナミクスよりも遅くなることで、水和水の吸収がバルク水よりも小さくなるために生じる [95]。

本研究では、開発した装置により測定した純水とリゾチーム水溶液のスペクトルを Vinh らの手法により解析を行った。リゾチーム水溶液中に含まれる水の量を調べるために、市販の密度計 (DMA 35, Anton Paar, Austria) を用いてリゾチーム水溶液の密度 ρ_L を測定した。その結果を図 3.2 に示す。密度 ρ_L は、リゾチーム濃度 c_L の増加と共に直線的に増加した。そのため、リゾチームの密度の変化を最小二乗法による直線フィッティングを行った。フィッティングの結果、密度 ρ_L (g/cm^3) とリゾチーム濃度 c_L (mg/mL) との間に有る関係は、

$$\rho_L(c_L) = (3.08 \pm 0.02) \times 10^{-4} c_L + (0.9980 \pm 0.0002) \text{ g}/\text{cm}^3 \quad (3.1)$$

となった。最小二乗法により得られる誤差は、測定値がフィッティング直線に対して正規分布する

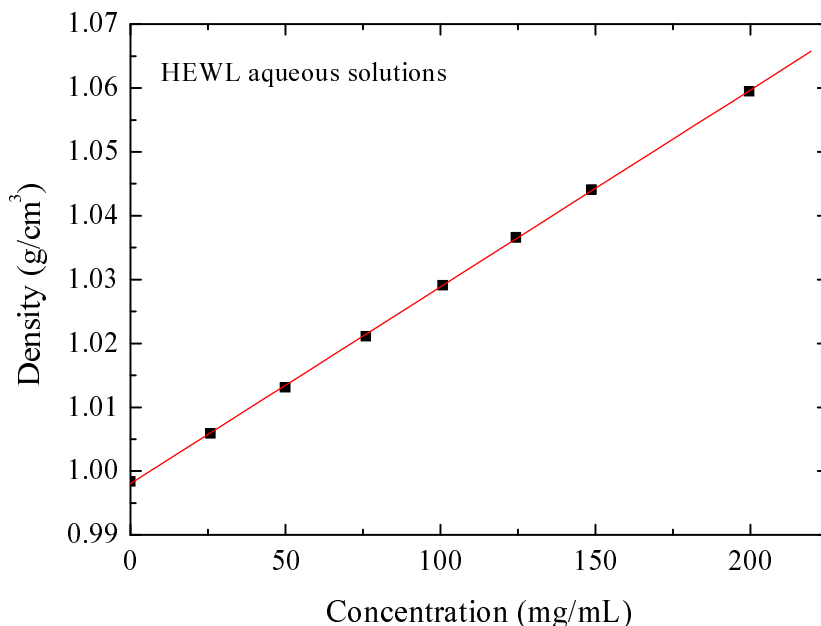


図 3.2. リゾチーム水溶液の密度 (20 °C)

と仮定のもとで、測定値の 68 % が誤差の範囲に含まれることを意味している。フィッティングパラメータの誤差は、密度計の誤差 ($\pm 0.001 \text{ g/cm}^3$) を考慮せずにフィッティングを行った結果得られた値である。フィッティング結果から、純水の密度を $\rho_W = \rho_L(c_L = 0 \text{ mg/mL}) = (0.9980 \pm 0.0002) \text{ g/cm}^3$ 、200 mg/mL リゾチーム水溶液の密度を $\rho_{L200} = \rho_L(c_L = 200 \text{ mg/mL}) = (1.0597 \pm 0.0006) \text{ g/cm}^3$ と計算した。

リゾチーム水溶液の吸収とその水溶液中に含まれる水による吸収との差スペクトル $\Delta\alpha(\omega, c_L)$ は、

$$\Delta\alpha(\omega, c_L) = \alpha_L(\omega, c_L) - \frac{\rho_L(c_L) - c_L}{\rho_W} \alpha_W(\omega) \quad (3.2)$$

により計算できる。ただし、 $\alpha_L(\omega, c_L)$ は濃度 c_L におけるリゾチーム水溶液の吸収係数、 $\alpha_W(\omega)$ は純水の吸収係数である。 $\frac{\rho_L(c_L) - c_L}{\rho_W}$ は、純水の単位体積あたりの質量に対するのリゾチーム水溶液単位体積あたりに含まれる水の質量の割合である。 ρ_W と ρ_{L200} の値は、図 3.2 のフィッティング結果から計算した値を用いた。得られた差スペクトルを図 3.3 に赤実線で示す。このスペクトルは、Vinh らにより報告されたスペクトルよりも小さかった。

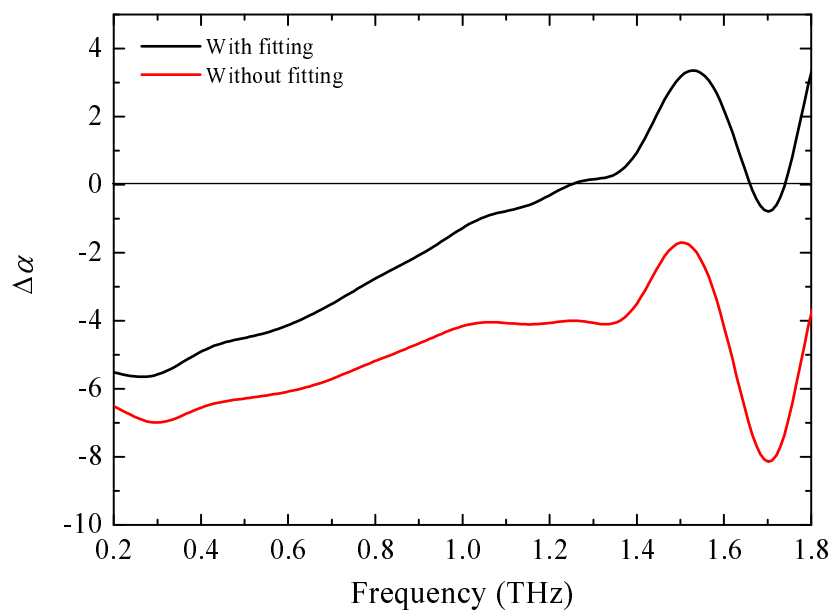


図 3.3. リゾチーム水溶液と純水との差スペクトル。(赤) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加したときのフィッティング結果を用いて算出したスペクトル、(黒) 純水とリゾチーム水溶液の吸収スペクトルから直接算出したスペクトル

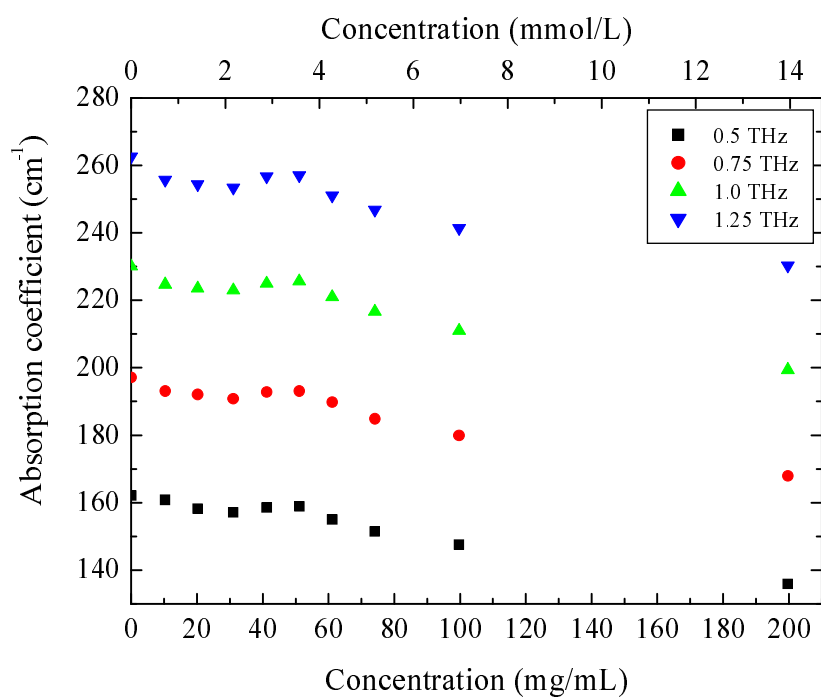


図 3.4. 様々な振動数でのリゾチーム水溶液の吸収係数のリゾチーム濃度依存性

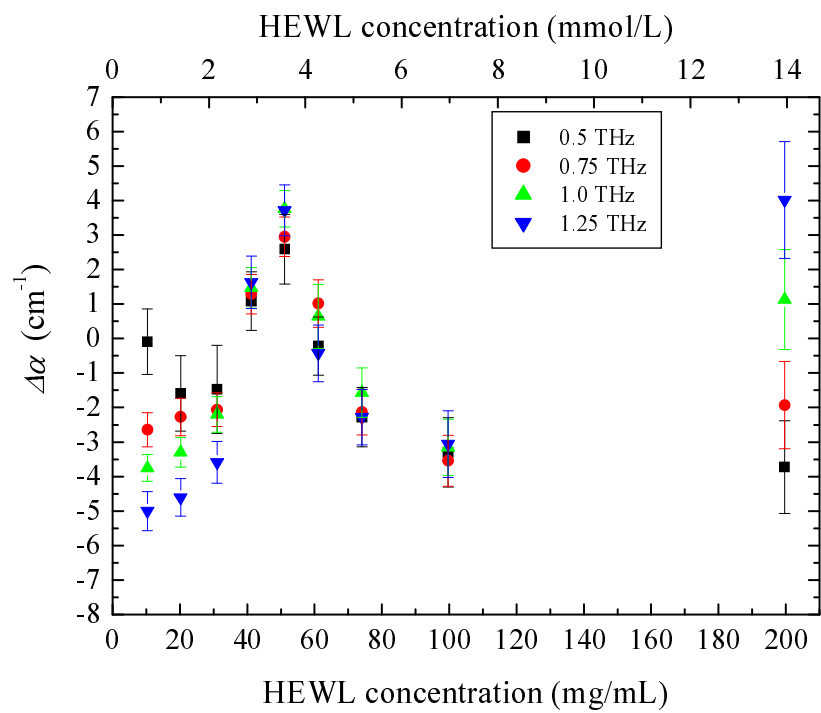


図 3.5. 様々な振動数でのリゾチーム水溶液の吸収とそこに含まれる水の吸収との差スペクトルの
リゾチーム濃度依存性

ここで、差スペクトルの示すものを具体的に考察する。リゾチーム水溶液は、バルク水、リゾチームの水和水、リゾチームの3つの成分からなるものとする。リゾチーム水溶液の吸収 $\alpha_L(\omega)$ は、3つの成分の吸収に次のように分解できる。

$$\alpha_L(\omega) = m_{\text{bulk}} \alpha_{\text{bulk}}(\omega) + m_{\text{hyd}} \alpha_{\text{hyd}}(\omega) + m_{\text{lys}} \alpha_{\text{lys}}(\omega) \quad (3.3)$$

ここで、 m_{bulk} 、 m_{hyd} 、および m_{lys} は純粋なバルク水、リゾチームの水和水、リゾチームの単位体積あたりの質量に対するリゾチーム水溶液単位体積あたりに含まれるバルク水、水和水、リゾチームの質量の割合であり、 α_{bulk} 、 α_{hyd} 、および α_{lys} はバルク水、水和水、リゾチームの単位体積あたりの吸収係数である。密度測定により明らかになる量は、単位体積あたりのリゾチーム水溶液中に含まれる水の質量であり、バルク水と水和水を合わせた質量である。従って、密度測定により知ることができる量は、 $m_{\text{bulk}} + m_{\text{hyd}}$ である。このモデルにおいて、式 (3.2) から計算される差スペクトル $\Delta\alpha(\omega)$ は、式 (3.3) を用いることで、

$$\begin{aligned} \Delta\alpha(\omega) &= \alpha_L(\omega) - (m_{\text{bulk}} + m_{\text{hyd}}) \alpha_{\text{bulk}}(\omega) \\ &= m_{\text{bulk}} \alpha_{\text{bulk}}(\omega) + m_{\text{hyd}} \alpha_{\text{hyd}}(\omega) + m_{\text{lys}} \alpha_{\text{lys}}(\omega) - (m_{\text{bulk}} + m_{\text{hyd}}) \alpha_{\text{bulk}}(\omega) \\ &= m_{\text{hyd}} (\alpha_{\text{hyd}}(\omega) - \alpha_{\text{bulk}}(\omega)) + m_{\text{lys}} \alpha_{\text{lys}}(\omega) \end{aligned} \quad (3.4)$$

と表せる。差スペクトル $\Delta\alpha(\omega)$ は、リゾチームの吸収 $\alpha_{\text{lys}}(\omega)$ と、水和水とバルク水との吸収の差 $(\alpha_{\text{hyd}}(\omega) - \alpha_{\text{bulk}}(\omega))$ との和であることが分かる。さらに、差スペクトルが負であるということは、リゾチームの吸収 $\alpha_{\text{lys}}(\omega)$ よりも水和水とバルク水との吸収の差の絶対値 $|\alpha_{\text{hyd}}(\omega) - \alpha_{\text{bulk}}(\omega)|$ のほうが大きいことを示している。また、 $(\alpha_{\text{hyd}}(\omega) - \alpha_{\text{bulk}}(\omega))$ は負でなければならないことから、水和水の吸収 $\alpha_{\text{hyd}}(\omega)$ は、バルク水の吸収 $\alpha_{\text{bulk}}(\omega)$ よりも小さいことがわかる ($\alpha_{\text{hyd}}(\omega) < \alpha_{\text{bulk}}(\omega)$)。この結果は、リゾチームの水和水のダイナミクスがバルク水のダイナミクスよりも遅くなっていることを示している。

ここで、リゾチーム 200 mg/mL において、リゾチームの水和がどのような状態にあるかを知るために、様々なリゾチーム濃度 c_L におけるリゾチーム水溶液の吸収係数 $\alpha_L(\omega, c_L)$ のスペクトルを測定した。各リゾチーム濃度におけるスペクトルの形状は、図 3.1 に示す純水や 200 mg/mL リゾチーム水溶液のスペクトルとほぼ変わらなかった。リゾチーム濃度 c_L に対する吸収係数の変化を図 3.4 に示す。リゾチーム濃度 c_L が小さい領域では、 c_L の増加と共に吸収係数は減少した。さ

らに、 c_L が大きくなると、吸収は増加し、 $c_L = 50 \text{ mg/mL}$ 付近で吸収ピークとなる。さらに c_L が大きくなると単調に吸収は減少した。式(3.2)により様々なリゾチーム濃度における差スペクトルを計算した結果を示す。様々な振動数においてリゾチームの濃度に対する差スペクトル $\Delta\alpha(\omega, c_L)$ の変化を図3.5に示す。リゾチーム濃度 c_L がうすい領域では、示している全ての振動数において負であるが、 c_L の増加と共に $\Delta\alpha(\omega, c_L)$ は正となり、 50 mg/mL 付近でピークとなった。 $\Delta\alpha(\omega, c_L)$ の増加は、他のリゾチーム濃度と比べて、タンパク質の表面近傍の水分子の動きが速くなっていることを示している。水の動きが速くなることは、水素結合ネットワークが破壊されることにより起こると考えられる。 $\Delta\alpha(\omega, c_L)$ は、リゾチーム濃度 50 mg/mL のときがピークである。このときのタンパク質の中心間の距離は、タンパク質分子が水溶液中で格子状に配列していると仮定して計算すると 8 nm 程度であり、リゾチーム分子の直径を 3 nm [87] とするとリゾチーム分子の表面から最も遠い位置にある水までの距離は 2.5 nm 程度である。さらに c_L が増加すると、 $\Delta\alpha(\omega, c_L)$ は負となった。このことは、タンパク質表面近傍の水分子の動きが遅くなっていることを示している。本研究で議論するリゾチーム濃度 200 mg/mL の場合は、タンパク質分子の中心間距離が 5 nm 程度(タンパク質分子が水溶液中で格子状に配列していると仮定したときの値)のときであり、リゾチーム分子の表面から最も遠い位置にある水までの距離は 1 nm 程度である。このことから、本研究で扱っているリゾチーム 200 mg/mL 水溶液は、他の濃度よりもタンパク質の表面により近い水分子のダイナミクスを観測しているといえる。

Havenithらの研究グループでは、ラムダリプレッサー水溶液やユビキチン水溶液に対して、中間のタンパク質濃度で差スペクトルが増加することを報告している [22]。彼らが測定しているのは、 2.4 THz 付近であり、この振動数領域では水和によって水分子が動きにくくなると吸収は増加する [22]。彼らは、差スペクトルがいったん増加してから減少することをタンパク質の水和層の重なりで説明している。すなわち、低濃度においては、タンパク質の濃度増加にしたがって水和水の量が増加するが、タンパク質濃度がある濃度に達すると、隣り合うタンパク質分子の水和層同士が重なり合うため、水和水の量の増え方が緩やかになる。また、タンパク質濃度の増加によって、水溶液中に含まれる水分子の量自体が減少する。これらにより、結果としてタンパク質の濃度増加によって吸収は減少する。しかし、 2.4 THz では水和によって水分子の動きが遅くなると吸収は増加するが、 2 THz 以下では吸収は減少すると報告している。水和層が重なり合うという彼らのモデルによれば、 1 THz 付近では $\Delta\alpha(\omega, c_L)$ は正のピークを持たないと予想される。この矛盾については、さらに検討する必要があると考える。

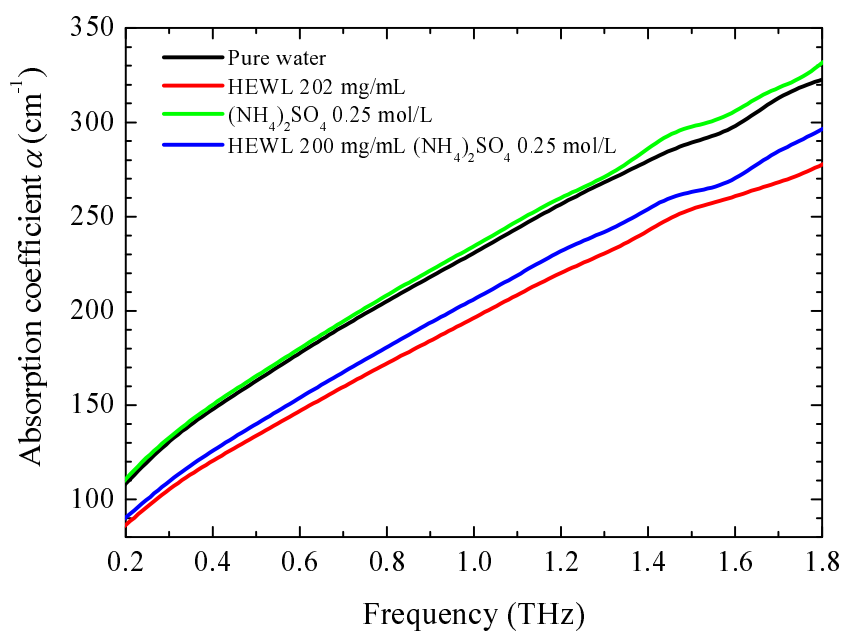


図 3.6. 純水 (黒)、リゾチーム 202 mg/mL 水溶液 (赤)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 mol/L 水溶液 (緑)、リゾチーム (200 mg/mL)- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 mol/L) 混合水溶液 (青) の吸収スペクトル.

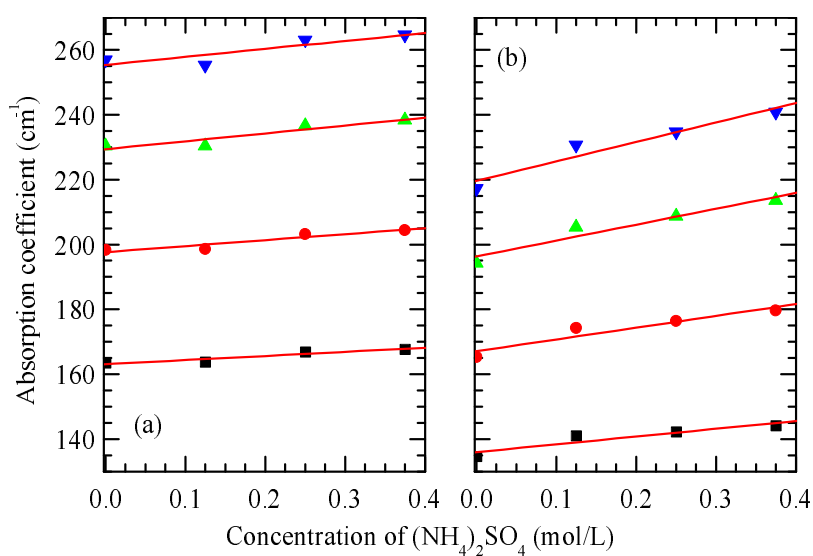


図 3.7. (a) 純水および (b) リゾチーム 200 mg/mL 水溶液の吸収係数の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度依存性.

■ : 0.5 THz, ● : 0.75 THz, ▲ : 1.0 THz, ▼ : 1.2 THz.

図 3.3 に赤実線で示すリゾチームの差スペクトルは、Vinh らにより報告されたスペクトルよりも小さかった。本研究では、より精度の高い解析を行うために、純水とリゾチーム水溶液に対してそれぞれ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加え、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対する吸収係数の変化を調べた。図 3.6 に、純水とリゾチーム 202 mg/mL 水溶液、およびそれらに $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えた水溶液の吸収スペクトルを示す。純水に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えた水溶液のスペクトルの形状は、純水のスペクトルの形状と大きな違いはなかった。また、リゾチーム水溶液に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えた水溶液のスペクトルの形状も、リゾチーム水溶液のスペクトルの形状と大きな違いはなかった。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加することで、測定した全ての振動数において、純水の吸収係数もリゾチーム水溶液の吸収係数も大きくなった。リゾチーム水溶液に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加したことによる吸収係数の増加分は、純水に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えたときの増加分よりもおよそ 2 倍大きかった。様々な振動数における $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対する純水の吸収係数の変化を図 3.7(a) に、リゾチーム水溶液の吸収係数の変化を図 3.7(b) に示す。純水とリゾチーム水溶液の吸収係数は、測定された周波数領域において、それぞれ塩濃度に対して直線的に変化した。このことから、全ての振動数において、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対する吸収係数の変化を最小二乗法を用いて直線によりフィッティングした。リゾチーム水溶液に対する傾きは、純水に対する傾きよりも 2 倍大きかった。このフィッティングの結果を用いて、純水とリゾチーム水溶液の吸収の差スペクトル $\Delta\alpha$ を式 (3.2) により求めた。得られた差スペクトル $\Delta\alpha$ を図 3.3 に黒実線で示す。差スペクトルは負となり、差スペクトルの大きさも形状も、Vinh らにより報告された差スペクトルに近づいた。より定量的にリゾチームの水和を評価するために、リゾチーム分子 1 個あたりに水和している水分子の数、すなわち水和数 N_{hyd} を計算した。この結果は、3.2 節において $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ がリゾチームの水和状態に与える影響と合わせて示す。

3.2 硫酸アンモニウムがリゾチームの水和に与える影響

図 3.7 において、どの周波数でも、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対するリゾチーム水溶液の吸収の傾きは純水の傾きよりもおよそ 2 倍大きかった。塩を添加したリゾチーム水溶液の FT-IR 分光の結果 (図 2.4) から、リゾチームの構造は塩の添加によって変化しないことを確認した。したがって、テラヘルツ帯におけるリゾチームの吸収は塩の添加により変わらないと考えられる。このことから、リゾチーム水溶液と純水の吸収の傾きの差は、リゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスが $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の添加により変化しているために生じると考えられる。

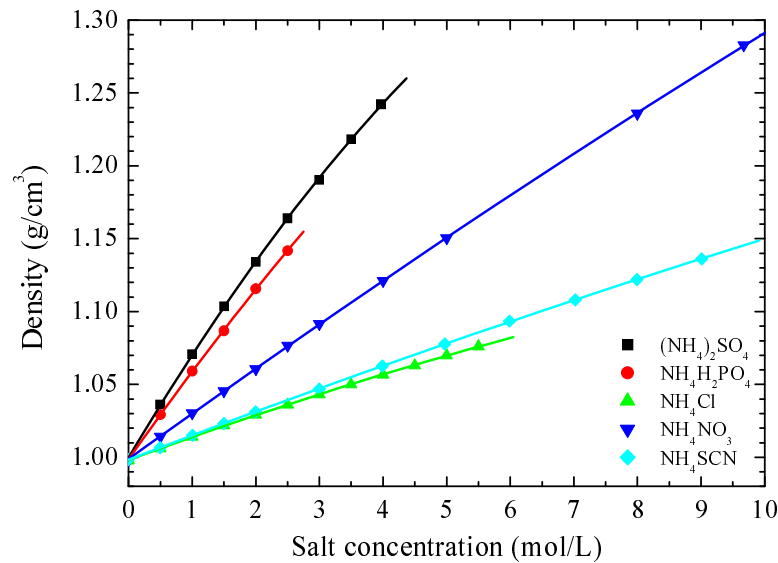


図 3.8. 塩水溶液の密度。それぞれの塩水溶液に対するフィッティングの切片 a_{S1} が、リゾチーム水溶液の密度測定で得られた純水の密度 ρ_W となるように補正をかけてある。補正は、 $\rho_W - a_{S1}$ を全ての測定値に加算することで行った。

塩の添加によるリゾチームの水和状態の変化を調べるために、様々な塩濃度において、リゾチーム-塩混合水溶液と塩水溶液の吸収の差スペクトル $\Delta\alpha(c_S, \omega)$ を計算した。計算には、式 (3.2) を塩濃度が 0 でない場合に拡張した式を用いた。

$$\Delta\alpha(c_S, \omega) = \alpha_{LS}(c_S, \omega) - \frac{\rho_{LS}(c_S) - c_L}{\rho_S(c_S)} \alpha_S(c_S, \omega) \quad (3.5)$$

ここで、 $\rho_{LS}(c_S)$ はリゾチーム-塩混合水溶液の密度、 $\rho_S(c_S)$ は塩水溶液の密度、 c_L はリゾチームの濃度、 c_S は塩濃度、 $\alpha_{LS}(c_S, \omega)$ はリゾチーム (濃度 c_L)-塩混合水溶液の吸収係数、 $\alpha_S(c_S, \omega)$ は塩水溶液の吸収係数である。この式の第 2 項目の係数 $\frac{\rho_{LS}(c_S) - c_L}{\rho_S(c_S)}$ により、塩水溶液の単位体積あたりの質量に対するリゾチーム-塩水溶液単位体積あたりに含まれる塩水溶液の質量の割合を考慮している。この割合の計算には、次の段落に示す水溶液試料の密度測定の結果を用いた。また、 $\alpha_{LS}(c_S, \omega)$ と $\alpha_S(c_S, \omega)$ の値は、図 3.7 で求めたフィッティング後の吸収係数を用いた。

リゾチーム-(NH₄)₂SO₄ 混合水溶液中に含まれる (NH₄)₂SO₄ 水溶液の割合を計算するために、(NH₄)₂SO₄ 水溶液の密度 $\rho_S(c_S)$ とリゾチーム-(NH₄)₂SO₄ 混合水溶液の密度 $\rho_{LS}(c_S)$ を様々な

表 3.1. 塩水溶液の密度のフィッティング結果 (20 °C)

塩	a_{S1}	a_{S2}	a_{S3}
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.9995 ± 0.0007	0.0739 ± 0.0008	-0.0033 ± 0.0002
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.9985 ± 0.0005	0.0623 ± 0.0009	-0.0020 ± 0.0009
NH_4Cl	0.9981 ± 0.0002	0.0161 ± 0.0002	$(-3.6 \pm 0.3) \times 10^{-4}$
NH_4NO_3	0.9987 ± 0.0002	0.0315 ± 0.0001	$(-2.3 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
NH_4SCN	0.9984 ± 0.0002	0.0168 ± 0.0001	$(-1.6 \pm 0.1) \times 10^{-4}$

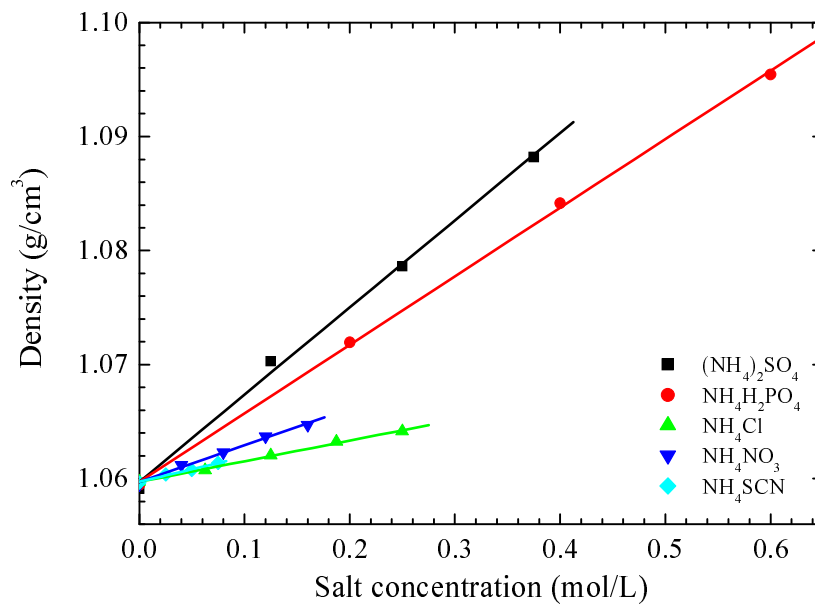


図 3.9. リゾチーム 200 mg/mL-塩混合水溶液の密度。それぞれのリゾチーム-塩混合水溶液に対するフィッティングの切片 a_{L1} が、リゾチーム水溶液の密度測定で得られたリゾチーム 200 mg/mL 水溶液の密度 ρ_{L200} となるように補正をかけてある。補正は、 $\rho_{L200} - a_{L1}$ を全ての測定値に加算することで行った。

表 3.2. リゾチーム (200 mg/mL)-塩水溶液の密度のフィッティング結果 (20 °C)

塩	a_{L1}	a_{L2}
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0592 ± 0.0007	0.076 ± 0.003
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0590 ± 0.0004	0.060 ± 0.001
NH_4Cl	1.0587 ± 0.0001	0.018 ± 0.001
NH_4NO_3	1.0589 ± 0.0003	0.030 ± 0.003
NH_4SCN	1.0562 ± 0.0001	0.022 ± 0.002

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度で測定した。その結果をそれぞれ図 3.8 と図 3.9 に黒で示す。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の密度は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度の増加と共に、傾きが緩やかになった。3.3 節で述べる様々な塩水溶液の密度も同様であった。そこで、塩濃度 c_S に対する密度の変化を最小二乗法を用いて 2 次関数

$$\rho_S = a_{S1} + a_{S2} c_S + a_{S3} c_S^2 \quad (3.6)$$

でフィットした。得られたフィッティングパラメーターを表 3.1 に示す。フィッティングパラメーターの誤差は、密度計の誤差 ($\pm 0.001 \text{ g/cm}^3$) を考慮せずに計算した結果である。フィッティング曲線の切片 a_{S1} の値は、塩の種類によって異なっている。この差は、3.3 節で塩による水和状態の変化の違いを比較するときに影響を与える。そこで、図 3.2 で得られた純水の密度 $\rho_W = 0.9980 \text{ g/cm}^3$ を a_{S1} の値として用いた。リゾチーム (200 mg/mL)- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の密度は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度の増加と共に、直線的に増加した。リゾチームと $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 以外の塩との混合水溶液の密度も同様であった。そのため、塩濃度 c_S に対する密度の変化を最小二乗法を用いて 1 次関数

$$\rho_{LS} = a_{L1} + a_{L2} c_S \quad (3.7)$$

でフィットした。その結果を表 3.2 に示す。フィッティングパラメーターの誤差は、密度計の誤差 ($\pm 0.001 \text{ g/cm}^3$) を考慮せずにフィッティングを行った結果得られた値である。フィッティング直線の切片 a_{L1} の値には、塩水溶液の場合と同様に、塩による水和状態の変化の違いを比較するときにフィッティング切片の違いの影響を避けるために、図 3.2 で得られた 200 mg/mL リゾチーム水溶液の密度 $\rho_L = 1.0597 \text{ g/cm}^3$ を用いた。図 3.10 に、様々な $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度において式 (3.5)

により計算した、リゾチーム- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合水溶液と $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の吸収の差スペクトル $\Delta\alpha(c_S, \omega)$ を示す。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度の増加とともに $\Delta\alpha$ は増加した。この結果は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ によってリゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスが速まることを示している。ここで、図 3.11 に、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対する吸収係数のフィッティング (図 3.7) の結果を用いずに、測定結果から直接計算した差スペクトルについても示す。フィッティング結果を用いずに求めた差スペクトルは、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対する規則性があるようには見えない。フィッティングを行うことにより、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対する差スペクトル $\Delta\alpha$ の変化を調べることができるといえる。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ によるダイナミクスの変化を水和数 N_{hyd} (リゾチーム分子 1 個あたりの水和層内にある水分子の数) によって評価した。このとき、Vinh らの報告に従って、次の 2 つの仮定をした。ひとつは、水和水の吸収は全ての振動数において 0 である [95] ということである。もうひとつは、リゾチームの吸収は差スペクトル $\Delta\alpha(c_S, \omega)$ が極小値をとる振動数 ν_{min} において 0 である [95] ということである。これらの仮定の下では、差スペクトルの極小値 $\Delta\alpha(\nu_{\text{min}})$ は、バルク水がリゾチーム水和水となったことによる吸収係数の変化に等しい。このことから、 ν_{min} において差スペクトル $\Delta\alpha(c_S, \omega)$ が 0 からどの程度下がっているか、すなわち $\Delta\alpha(c_S, \nu_{\text{min}})$ の大きさをバルク水の量に換算し、次の式を用いて水和数 N_{hyd} を計算した。

$$N_{\text{hyd}}(c_S) = \frac{\Delta\alpha(c_S, \nu_{\text{min}})}{\alpha_{\text{bulk}}(\nu_{\text{min}})} \rho_W \frac{1}{M_W} \frac{1}{M_L} \quad (3.8)$$

ここで、 M_W は水の分子量 ($M_W = 18$ Da) であり、 M_L はリゾチームの分子量 ($M_L = 14307$ Da) である。また、差スペクトルが極小値をとる振動数は、 $\nu_{\text{min}} = 0.26$ THz であった。様々な $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度において N_{hyd} を計算した。その結果、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対して N_{hyd} は直線的に変化した。そこで、 N_{hyd} の変化を直線

$$N_{\text{hyd}} = a_{N1} + a_{N2} c_S \quad (3.9)$$

によりフィッティングした。その結果、 N_{hyd} は塩濃度 c_S (mol/L) の関数として、 $N_{\text{hyd}} = (182 \pm 30) - (201 \pm 130)c_S$ となった。この一次関数の傾きと切片の誤差は、図 3.7 で得られたフィッティングパラメーターの誤差から計算した値である。ここで、実際の水溶液においては、バルク水とリゾチームの水和水とを明確に区別する境界は無いということに注意する。従って、ここで得られる

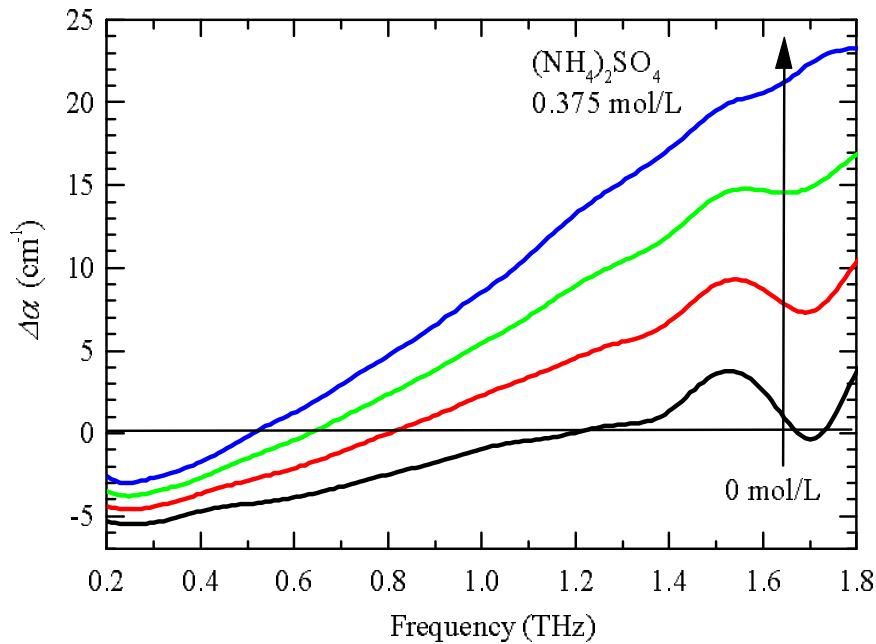


図 3.10. リゾチーム水溶液と純水の吸収の差スペクトルとその $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度依存性. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0 mol/L (黒)、0.125 mol/L (赤)、0.25 mol/L (緑)、0.375 mol/L (青).

水和数 N_{hyd} は、リゾチームの周りの水分子のうごきやすさを示す実効的な値である。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加していないリゾチーム水溶液では、リゾチーム分子 1 個あたりに水和している水分子の数は 182 個であった。182 個は水和層の厚さにして、1.3 Å であった。水和層の厚さは、リゾチーム分子を $30 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA} \times 45 \text{ \AA}$ のラグビーボール型 [87] とし、その周りにバルク水と同じ密度の水和水の層が存在するとして計算した。水分子の直径は、バルク水の密度から水分子 1 個あたりの体積を計算し、水分子が球状であるとして計算すると、3.8 Å であるので、本実験で見積もられた水和層の厚さは水分子 1 層分よりも薄いといえる。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加すると、水和水のダイナミクスが速くなることにより 1 mol/L あたり 201 個の水和水がバルク水に変化する。

3.3 様々な塩がリゾチームの水和水に与える影響

前節において、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に対して行った実験を、陰イオンの種類を変えて 4 種類の塩 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 NH_4SCN) に対して行った。その結果から、リゾチームの水和に対する陰イオンの影響が Hofmeister 系列に従うかを調べた。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に対してはそれぞれの塩濃度において

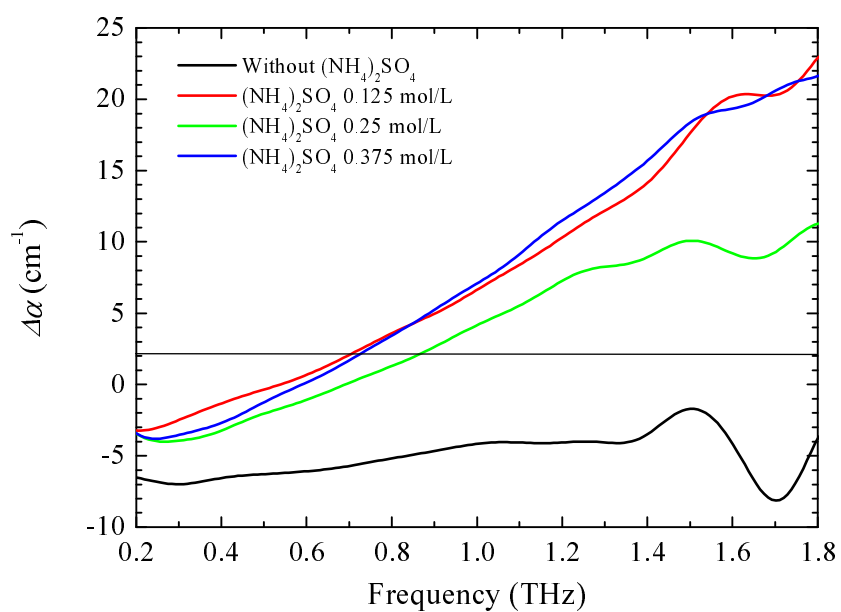


図 3.11. 様々な $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度におけるリゾチーム (200 mg/mL)- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合水溶液とそこに含まれる $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液の吸収との差スペクトル。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度に対する吸収係数のフィッティング結果 (図 3.7) を用いず、測定結果から直接計算した結果である。

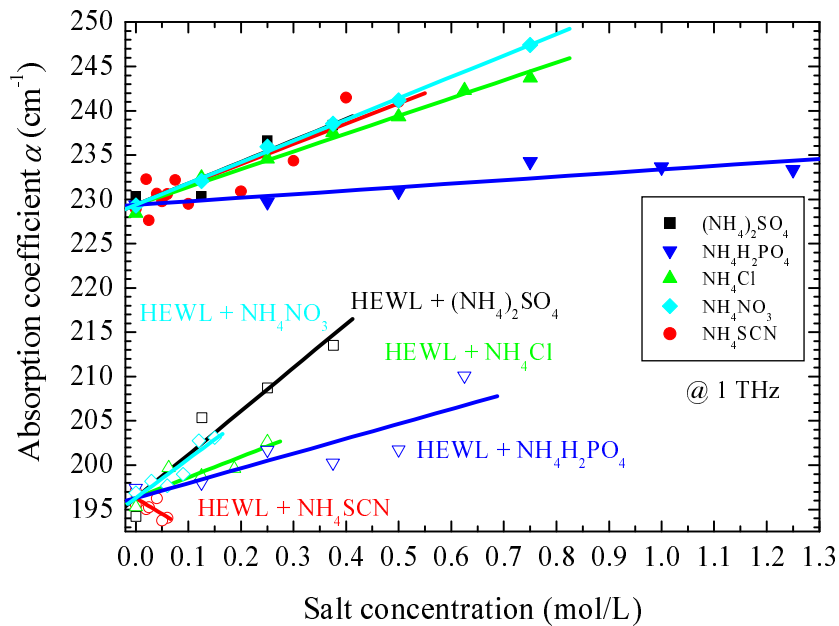


図 3.12. 周波数 1 THz における純水とリゾチーム 200 mg/mL 水溶液の吸収係数の塩濃度依存性.

試料作成から測定までの過程を 3 回ずつ行い、得られた吸収係数スペクトルの平均をとったが、他の 4 種類の塩に対する実験は 1 回のみ行った。測定した全ての吸収スペクトルの形状は、純水やリゾチーム水溶液のスペクトル形状と大きな差は無く、特徴的なピークの無いブロードなスペクトルであった。5 つの塩に対して、1 THz を例に純水とリゾチーム水溶液の吸収係数の塩濃度依存性を図 3.12 に示す。測定した全ての水溶液において、吸収係数は塩濃度の増加とともに直線的に変化した。このことから、吸収係数の変化を直線でフィッティングした。純水に塩を加えたときの吸収係数の変化は、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ を除いて塩の種類に依存しなかった。本研究で調べた 5 つの塩のうち、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ だけがプロトンを含む塩である。このことから、プロトンが塩水溶液の吸収の傾きに影響を与えたと予想される。リゾチーム 200 mg/mL 水溶液に塩を加えたときの吸収係数の変化は、塩の種類によって異なった。塩によるリゾチームの水和状態の変化を知る上で重要なことは、純水に対する吸収係数の傾きとリゾチーム水溶液に対する傾きとの差である。0.5, 0.75, 1.25 THz における純水とリゾチーム水溶液の吸収係数の塩濃度依存性をそれぞれ図 3.13、3.14、3.15 に示す。1 THz において見られる傾向は、他の振動数においても見られることが分かる。

塩の種類によるリゾチームの水和への影響の違いを調べるため、式 (3.5) により差スペクトルを

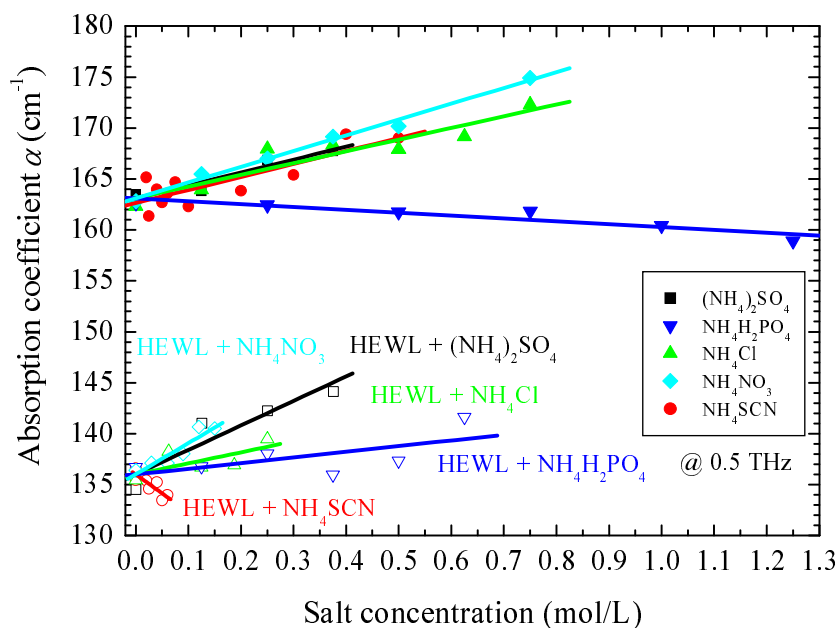


図 3.13. 周波数 0.5 THz における純水とリゾチーム 200 mg/mL 水溶液の吸収係数の塩濃度依存性.

計算した。 α_{LS} と α_S の値には、図 3.12 から図 3.15 を含む全ての振動数で行ったフィッティング結果を用いた。 ρ_{LS} と ρ_S の値には、図 3.8 と 3.9 に示す密度測定の結果をフィッティングすることによって得られた結果 (表 3.1、3.2) を用いた。その結果を図 3.16 に示す。強いコスモトロープである $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加することで、差スペクトル $\Delta\alpha(c_S, \omega)$ は増加した。 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ を添加したときも、 $\Delta\alpha(c_S, \omega)$ は増加した。Hofmeister 系列の中間に位置する NH_4Cl を添加したときには、差スペクトルが揺らいでいるが、塩の添加による差スペクトルの大きな変化は見られなかった。 NH_4NO_3 を添加すると、 $\Delta\alpha(c_S, \omega)$ は増加した。強いカオトロープである NH_4SCN を添加すると、 $\Delta\alpha(c_S, \omega)$ は減少した。以上の結果は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4NO_3 はリゾチームの水和水のダイナミクスを速め、 NH_4SCN はリゾチームの水和水のダイナミクスを遅くすることを示している。また、 NH_4Cl はリゾチームの水和水のダイナミクスに大きな影響を与えないことを示している。

得られた差スペクトルから、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加したときの解析と同様に、差スペクトルから塩によるリゾチームの水和数 $N_{\text{hyd}} (= a_{N1} + a_{N2} c_S)$ の変化を計算することを試みた。しかし、 NH_4SCN を添加した場合には、差スペクトル $\Delta\alpha$ が最小となる振動数 ν_{min} において、水和数 N_{hyd} の計算

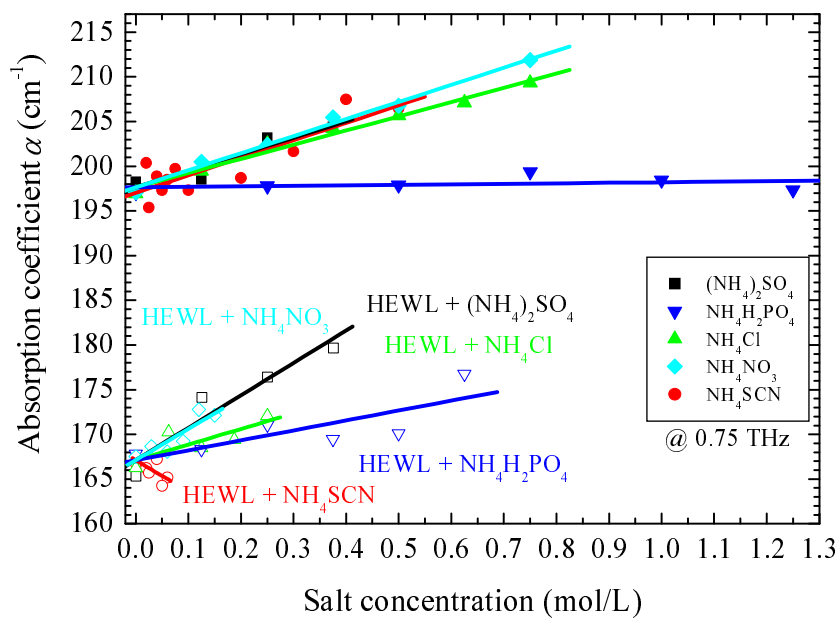


図 3.14. 周波数 0.75 THz における純水とリゾチーム 200 mg/mL 水溶液の吸収係数の塩濃度依存性.

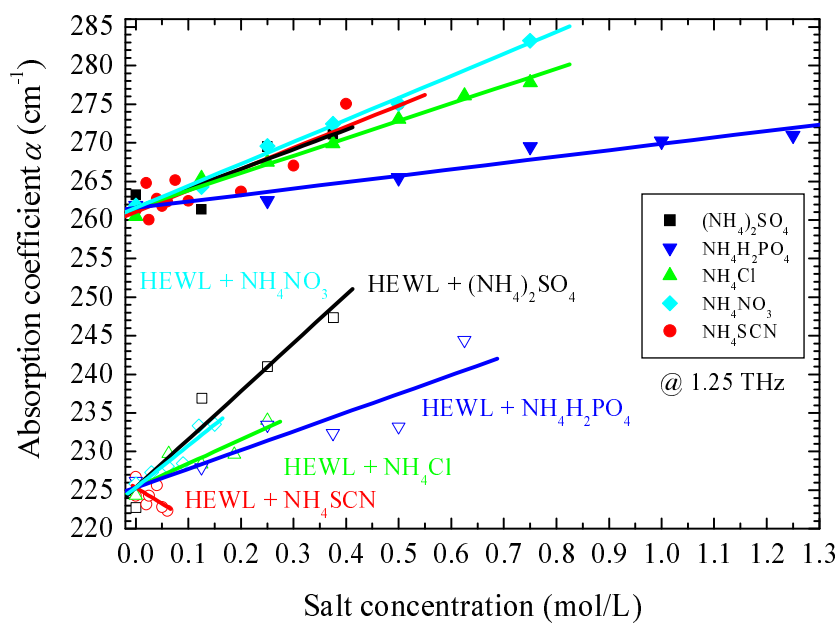


図 3.15. 周波数 1.25 THz における純水とリゾチーム 200 mg/mL 水溶液の吸収係数の塩濃度依存性.

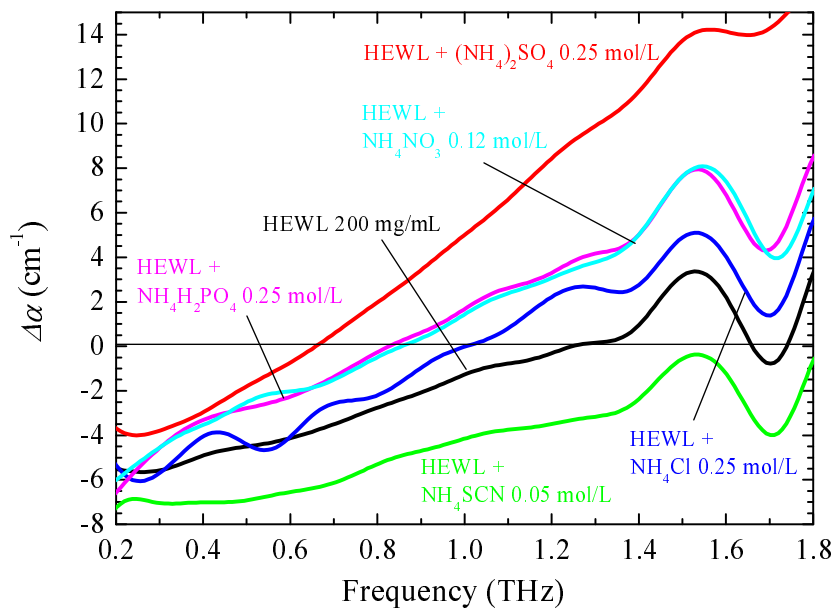


図 3.16. リゾチーム 200 mg/mL-塩混合水溶液とその水溶液中に含まれる塩水溶液との差スペクトル.

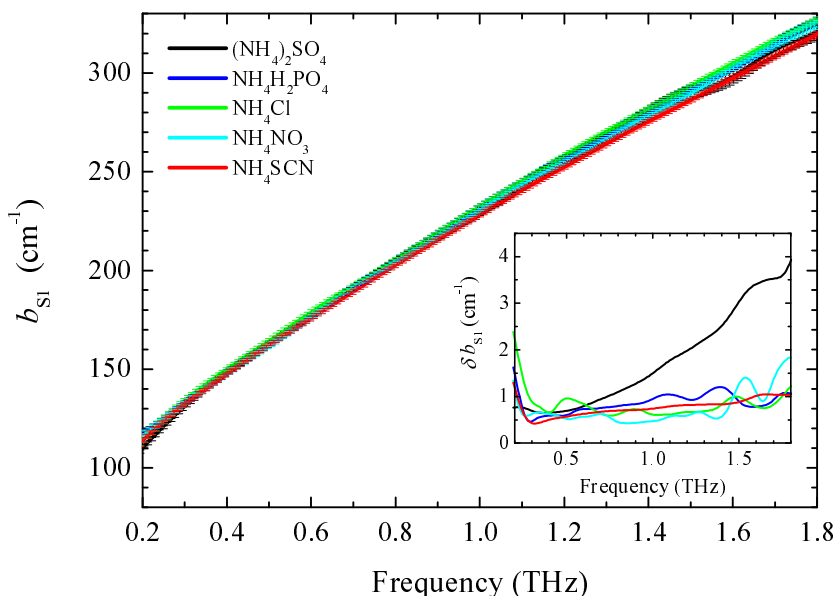


図 3.17. 塩水溶液の吸収係数の塩濃度に対する直線フィットにより得られたフィッティングパラメータ $b_{S1}(\omega)$ のスペクトル。実線の周りの帯はエラーバーであり、 $b_{S1}(\omega)$ の誤差 $\pm \delta b_{S1}(\omega)$ を示している。 $\delta b_{S1}(\omega)$ のスペクトルを挿入図に示す。

するための十分な吸収係数の精度が得られなかった。 NH_4Cl を添加した場合は、差スペクトルに揺らぎが乗っているため、水和数 N_{hyd} の計算することは難しいと考えられる。リゾチームの吸収は、Vinh らの仮定を用いても、 ν_{min} よりも高い振動数ではリゾチームの吸収を無視できないことから、それぞれの塩を添加した場合について、塩が含まれていない場合のリゾチームの水和数 $N_{\text{hyd}}(c_S = 0)$ を評価することは難しい。一方で、塩の添加によってリゾチームの吸収は変化しないことが示唆されていることから、塩の添加による N_{hyd} の傾きを評価することは可能であると考えられる。

塩の添加によるリゾチームの水和数の変化 a_{N2} を計算する式を導く。純水に塩を添加したときの吸収係数の変化を、最小二乗法を用いて1次関数によりフィットした。その1次関数を

$$\alpha_S(c_S, \omega) = (b_{S1}(\omega) \pm \delta b_{S1}(\omega)) + (b_{S2}(\omega) \pm \delta b_{S2}(\omega)) c_S \quad (3.10)$$

と表す。フィッティングにより得られた $b_{S1}(\omega)$ と $b_{S2}(\omega)$ をそれぞれ図 3.17 と 3.18 に示す。フィッ

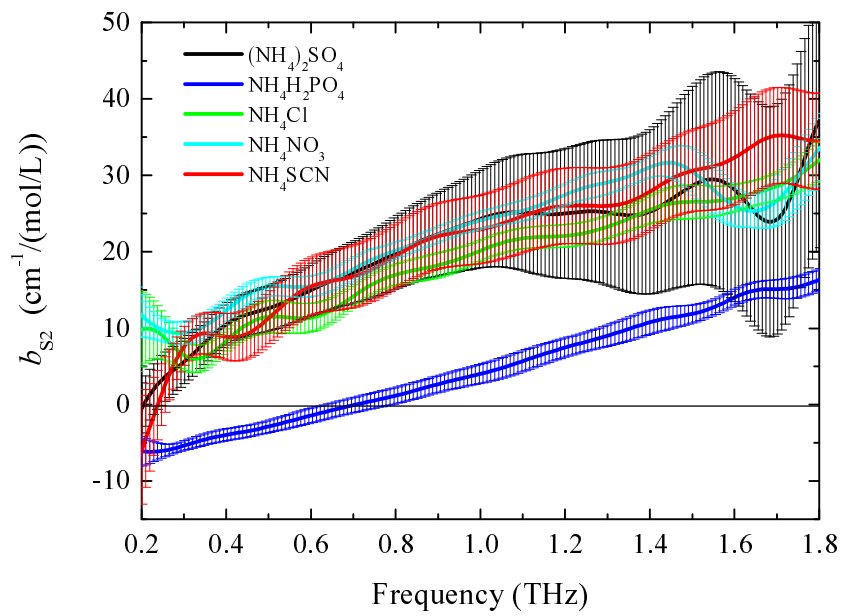


図 3.18. 塩水溶液の吸収係数の塩濃度に対する直線フィットにより得られたフィッティングパラメータ $b_{S2}(\omega)$ のスペクトル。実線の周りの帯はエラーバーであり、 $b_{S2}(\omega)$ の誤差 $\pm\delta b_{S2}(\omega)$ を示す。

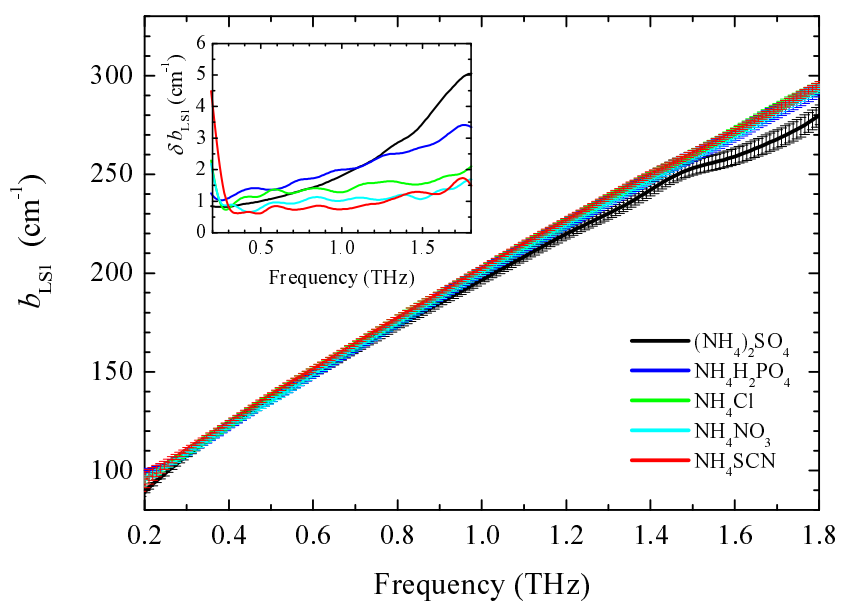


図 3.19. リゾチーム 200 mg/mL-塩混合水溶液の吸収係数の塩濃度に対する直線フィットにより得られたフィッティングパラメータ $b_{LS1}(\omega)$ のスペクトル。実線の周りの帯はエラーバーであり、 $b_{LS1}(\omega)$ の誤差 $\pm \delta b_{LS1}(\omega)$ を示している。 $\delta b_{LS1}(\omega)$ のスペクトルを挿入図に示す。

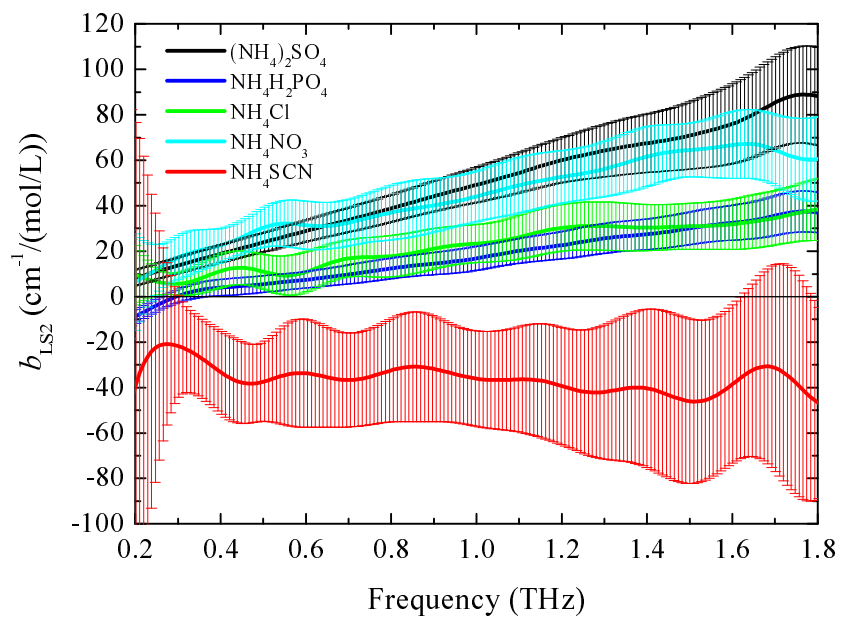


図 3.20. リゾチーム 200 mg/mL-塩混合水溶液の吸収係数の塩濃度に対する直線フィットにより得られたフィッティングパラメータ $b_{\text{LS2}}(\omega)$ のスペクトル。実線の周りの帯はエラーバーであり、 $b_{\text{LS2}}(\omega)$ の誤差 $\pm \delta b_{\text{LS2}}(\omega)$ を示す。

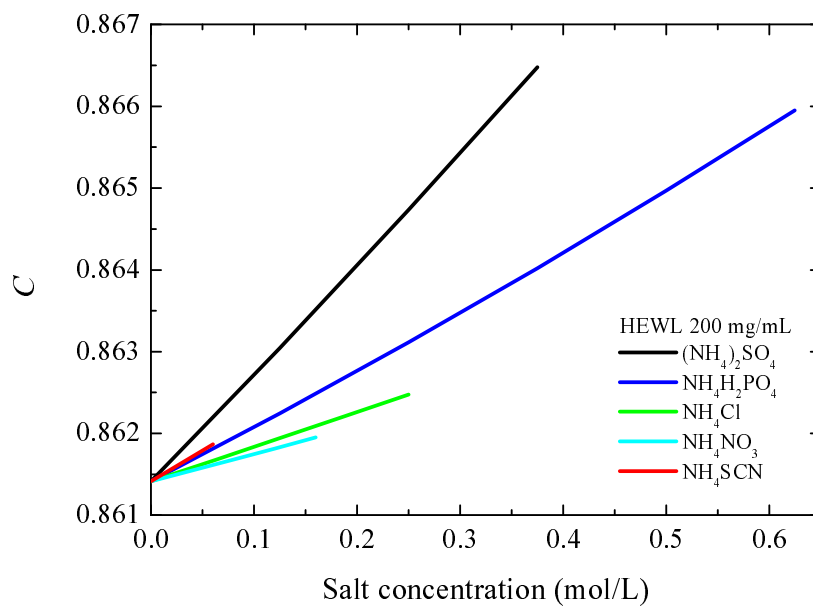


図 3.21. 塩水溶液の単位体積あたりの質量に対する単位体積あたりのリゾチーム 200 mg/mL-塩混合水溶液に含まれる塩水溶液の質量の割合

ティングを行うとき、それぞれの測定値は、解析を行った全ての振動数領域において、THz-TDS 分光装置のランダム誤差 0.6 cm^{-1} の誤差を持つとして誤差の計算を行った。同様に、200 mg/mL リゾチーム水溶液に塩を添加したときの吸収係数の変化も最小二乗法を用いて1次関数によりフィットした。その関数を

$$\alpha_{\text{LS}}(c_{\text{S}}, \omega) = (b_{\text{LS1}}(\omega) \pm \delta b_{\text{LS1}}(\omega)) + (b_{\text{LS2}}(\omega) \pm \delta b_{\text{LS2}}(\omega)) c_{\text{S}} \quad (3.11)$$

と表す。フィッティングにより得られた $b_{\text{LS1}}(\omega)$ と $b_{\text{LS2}}(\omega)$ をそれぞれ図 3.19 と 3.20 に示す。フィッティングを行うとき、それぞれの測定値は、解析を行った全ての振動数領域において、THz-TDS 分光装置のランダム誤差 0.6 cm^{-1} の誤差を持つとして誤差の計算を行った。これらの式を式 (3.5) に代入すると、

$$\Delta\alpha(c_{\text{S}}, \omega) = \left\{ b_{\text{LS1}}(\omega) - \frac{\rho_{\text{LS}}(c_{\text{S}}) - c_{\text{L}}}{\rho_{\text{S}}(c_{\text{S}})} b_{\text{S1}}(\omega) \right\} + \left\{ b_{\text{LS2}}(\omega) - \frac{\rho_{\text{LS}}(c_{\text{S}}) - c_{\text{L}}}{\rho_{\text{S}}(c_{\text{S}})} b_{\text{S2}}(\omega) \right\} c_{\text{S}} \quad (3.12)$$

となる。ここで、 c_{S} の係数を

$$A_2(\omega) = \left\{ b_{\text{LS2}}(\omega) - \frac{\rho_{\text{LS}}(c_{\text{S}}) - c_{\text{L}}}{\rho_{\text{S}}(c_{\text{S}})} b_{\text{S2}}(\omega) \right\} \quad (3.13)$$

とおく。ここで、 $\frac{\rho_{\text{LS}}(c_{\text{S}}) - c_{\text{L}}}{\rho_{\text{S}}(c_{\text{S}})}$ は塩水溶液の単位体積あたりの質量に対する単位体積あたりのリゾチーム 200 mg/mL-塩混合水溶液に含まれる塩水溶液の質量の割合を示す係数であり、その値は図 3.21 に示すように塩濃度 c_{S} によって変化する。しかし、塩を加えることによる $\frac{\rho_{\text{LS}}(c_{\text{S}}) - c_{\text{L}}}{\rho_{\text{S}}(c_{\text{S}})}$ の値の変化は、加える前の値に対して 1 % 程度であり、大きくは変化はしない。そこで、この係数を

$$C \equiv \frac{\rho_{\text{LS}}(c_{\text{S}}) - c_{\text{L}}}{\rho_{\text{S}}(c_{\text{S}})} \quad (3.14)$$

とおけば、 C は定数とみなせる。 C の値には測定した最大塩濃度の $1/2$ の塩濃度における $\frac{\rho_{\text{LS}}(c_{\text{S}}) - c_{\text{L}}}{\rho_{\text{S}}(c_{\text{S}})}$ の値を用いた。塩濃度に対する C の変化分は C の誤差に繰り込んだ。式 (3.14) における C の誤差を計算するために、 $\rho_{\text{LS}}(c_{\text{S}})$ の誤差 $\delta\rho_{\text{LS}}$ 、 c_{L} の誤差 δc_{L} 、および $\rho_{\text{S}}(c_{\text{S}})$ の誤差 $\delta\rho_{\text{S}}$ を次のように計算した。 ρ_{LS} と ρ_{S} の計算では、図 3.2 に示すリゾチーム水溶液の密度のフィッティング結果を用いている。密度計の誤差 ($\pm 0.001 \text{ g/cm}^3$) も含めて純水とリゾチーム 200 mg/mL 水溶液の誤差を

表 3.3. 単位体積当たりでみたときの塩水溶液の質量に対するリゾチーム (200 mg/mL)-塩混合水溶液中に含まれる塩水溶液の質量の割合。 C の値は、図 3.21 から決定した値であり、誤差 δC の値は、塩濃度の変化による C の変化を繰り込んだ値

塩	$C \pm \delta C$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.864 ± 0.009
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.863 ± 0.008
NH_4Cl	0.862 ± 0.007
NH_4NO_3	0.862 ± 0.007
NH_4SCN	0.862 ± 0.007

計算するとそれぞれ ± 0.001 および $\pm 0.002 \text{ g/cm}^3$ である。これらの値に塩を添加したことによる密度変化 (表 3.1 および表 3.2) の誤差を加えることで、塩の種類によらず $\delta\rho_{\text{LS}} = \pm 0.002 \text{ g/cm}^3$ 、および $\delta\rho_{\text{S}} = \pm 0.001 \text{ g/cm}^3$ と計算した。リゾチーム濃度 c_{L} の誤差は、濃度校正に用いた UV-vis 分光光度計の誤差 (2%) と水溶液の希釈に用いたピペットの誤差から $\delta c_{\text{L}} = \pm 6 \text{ mg/mL}$ と計算した。以上の値を用いることで、 C の誤差を ± 0.006 と計算した。具体的な C の値と塩濃度の変化による C の変化を繰り込んだ誤差 δC を表 3.3 に示す。これにより、式 (3.13) で定義した $A_2(\omega)$ は、 c_{S} に対しては定数とみなせる。 $A_2(\omega)$ は、リゾチーム水溶液に塩を加えたときに生じる単位塩濃度あたりの吸収の差スペクトル $\Delta\alpha(c_{\text{S}} = 1 \text{ mol/L}, \omega)$ の変化であるといえる。図 3.22 に、それぞれの塩を添加した場合について求めた $A_2(\omega)$ のスペクトルを示す。図中の実線の周囲の帯はエラーバーであり、 $A_2(\omega)$ の誤差 $\delta A_2(\omega)$ を次の式で計算した。

$$\delta A_2(\omega) = \sqrt{(b_{\text{LS}2}(\omega))^2 + C^2 (b_{\text{S}2}(\omega))^2 \left\{ \left(\frac{\delta C}{C} \right)^2 + \left(\frac{\delta b_{\text{S}2}(\omega)}{b_{\text{S}2}(\omega)} \right)^2 \right\}} \quad (3.15)$$

どの塩においても、振動数の増加に伴って $A_2(\omega)$ の絶対値は大きくなった。 $A_2(\omega)$ は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 に対しては増加し、 NH_4SCN に対しては増加した。 $A_2(\omega)$ を大きい順に並べると、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{NH}_4\text{SCN}$ となった。

塩によるリゾチームの水和数の変化を示す一次関数の傾き (すなわち、塩 1 mol/L あたりの水和数の変化) $a_{\text{N}2}$ とその誤差 $\delta a_{\text{N}2}$ は、測定した振動数領域全域において、次の式により計算できる。

$$a_{\text{N}_2}(\omega) = \frac{A_2(\omega)}{b_{\text{S}_1}(\omega)} \rho_{\text{W}} \frac{1}{M_{\text{W}}} \frac{1}{M_{\text{L}}} \quad (3.16)$$

$$\delta a_{\text{N}_2}(\omega) = \left(\left| \frac{\delta A_2(\omega)}{A_2(\omega)} \right| + \left| \frac{\delta b_{\text{S}_1}(\omega)}{b_{\text{S}_1}(\omega)} \right| \right) a_{\text{N}_2}(\omega) \quad (3.17)$$

ここで、リゾチームの水和水の吸収は0であると仮定している。また、 $b_{\text{S}_1}(\omega)$ には、それぞれの塩ごとのフィッティング結果を用いている。誤差 $\delta A_2(\omega)$ と $\delta b_{\text{S}_1}(\omega)$ はどちらも最小二乗法によるフィッティングにより求まる測定値の誤差から計算される量であるので、これらの誤差は独立ではない。したがって、 $\delta a_{\text{N}_2}(\omega)$ の計算では、 $\frac{\delta A_2(\omega)}{A_2(\omega)}$ と $\frac{\delta b_{\text{S}_1}(\omega)}{b_{\text{S}_1}(\omega)}$ との二乗和の平方根ではなく、絶対値の和をとっている。得られた塩による水和数の変化率 a_{N_2} のスペクトルとその誤差 δa_{N_2} を図3.23に示す。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 は水和数を減少させ、 NH_4SCN は水和数を増加させた。これを水和数の増加の大きい順に並べると、 $\text{NH}_4\text{SCN} > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ となる。 NH_4SCN 以外の塩を添加した場合、振動数の増加と共に、 a_{N_2} の大きさは大きくなっていることが分かる。特に、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加した場合にはこれは顕著である。本来、リゾチームの水和数は、みる振動数が違っても変わらないべきである。振動数によって a_{N_2} が変わる理由として、水和水の吸収を0と仮定したことが考えられる。本実験で見ているものは、バルク水とリゾチームの水和水との吸収の差を見ているので、振動数によって a_{N_2} が変わることは、高周波側ほどバルク水に対するバルク水と水和水の吸収の差が大きいことを示している。

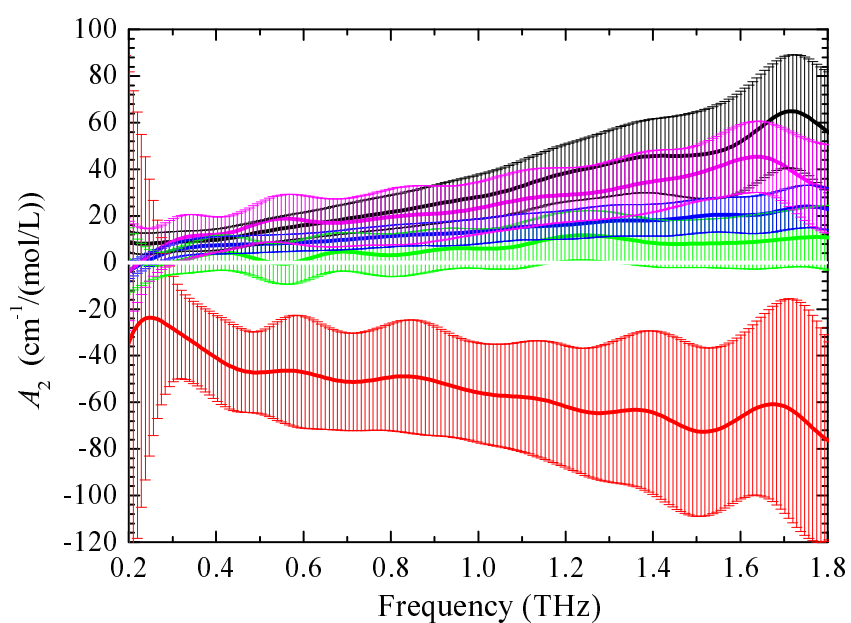


図 3.22. 塩 1 mol/L あたりのリゾチーム-塩混合水溶液とそこに含まれる塩水溶液との差スペクトルの変化率 A_2 のスペクトル。(黒： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、青： $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、緑： NH_4Cl 、深紅色： NH_4NO_3 、赤： NH_4SCN) 実線の周りの帯はエラーバーであり、 A_2 の誤差 $\pm\delta A_2$ を表している。

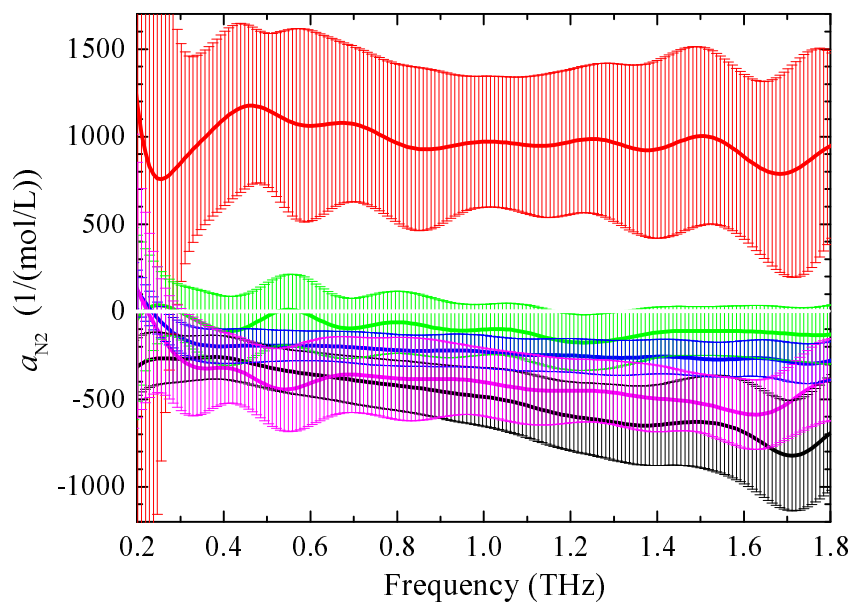


図 3.23. 塩 1 mol/L あたりのリゾチームの水和数の変化率 a_{N2} のスペクトル。(黒 : $(NH_4)_2SO_4$ 、青 : $NH_4H_2PO_4$ 、緑 : NH_4Cl 、深紅色 : NH_4NO_3 、赤 : NH_4SCN) 実線の周りの帯はエラーバーであり a_{N2} の誤差 $\pm\delta a_{N2}$ を表している。

第4章 考察

4.1 テラヘルツ分光で見たリゾチームの水和に対する塩の影響

塩を加えることによる差スペクトルの増加率 A_2 の大きさは、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{NH}_4\text{SCN}$ の順であった。このことから、全体的な傾向として、コスモトロープほど A_2 が大きく、カオトロープほど小さいといえる。また、リゾチームの水和数の変化率 a_{N_2} は、 $\text{NH}_4\text{SCN} > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ であった。このことから、全体的な傾向として、コスモトロープほど a_{N_2} が小さく、カオトロープほど大きいといえる。本研究で得られた水和水の増加率 a_{N} の順列を、陰イオンに着目してみると $\text{SCN}^- > \text{Cl}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{SO}_4^{2-}$ となる。これを陰イオンの Hofmeister 系列 ($\text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{SCN}^-$) と比較すると、塩による水和水の変化率に関する順序は、硝酸イオンを除けば、Hofmeister 系列の逆順と一致していることが分かる。すなわち、 SO_4^{2-} のようなコスモトロープは、リゾチームの水和水を減少させ、 SCN^- のようなカオトロープは水和水を増加させた。以上の結果は、コスモトロープはタンパク質近傍の水のダイナミクスを速め、コスモトロープは遅くすることを示している。

本研究で扱っている水和数は、80 ページで述べたように、リゾチームの周りの水分子のうごきやすさを示す実効的な値である。したがって、本実験の結果は、実際にリゾチームに水和している水分子の数が塩によってどのように変わるかを明確に示すものではないと考えられる。このことを示す例を挙げる。コスモトロープによって、リゾチーム近傍の水分子のダイナミクスが速くなる場合を考える。このとき、実際にリゾチームに水和している水分子の数について、次の2つの解釈ができる。ひとつは、リゾチームの水和層の厚さは変わらないが、その水和層内の水のダイナミクスが速くなったために、水和数が小さくなるという結果が得られたという解釈である。この解釈は、実際にリゾチームに水和している水分子の数は塩の添加によって変化せず、水和層内の水分子のダイナミクスのみが速くなることを示す。もうひとつは、水和層内の水のダイナミクスは変わらないが、水和層とバルク水との界面付近に位置する水和水のダイナミクスが速まってバルク水となり、その結果水和層が薄くなったという解釈である。この解釈は、水和層の厚さが変

わることによって実際にリゾチームに水和している水分子の数は減少することを示している。さらに、以上の2つが同時に起こっていることも考えられる。すなわち、水和層の厚さが薄くなることと水和層内の水分子のダイナミクスの速まることが同時に起こる場合、さらに、水和層の厚さは厚くなるがそれを打ち消すだけ水和層内の水分子のダイナミクスが速くなる場合や、水和層内の水分子のダイナミクスは速くなるがそれを打ち消すだけ水和層の厚さは薄くなる場合が考えられる。カオトロープによって、リゾチーム近傍の水分子のダイナミクスが遅くなる場合においても、同様の議論が可能である。いずれの場合にしても、本実験は、タンパク質近傍の水分子のダイナミクスの変化の平均的な情報を見ているといえる。以降の考察を、本実験によって明らかになった結果から行う。

本実験で得られた、塩がタンパク質近傍の水分子のダイナミクスに与える影響は、塩がバルク水のダイナミクスに与える影響とは逆である。すなわち、コスモトロープは、イオンの周りの水の構造を強めることから、バルク水の動きを遅くすると考えられる。一方、カオトロープはイオンの周りの水の構造を弱めることから、バルク水の動きを速くすると考えられる。この違いについて、4.2節で述べる。

4.2 水和水に対する陰イオンの影響と Collins の水和水モデル

Collins は、タンパク質の表面近傍の水分子に対する塩の影響に関するモデルを報告している [99]。このモデルは、 $\text{pH} > \text{pI}$ の場合について考えられたモデルである。そのモデルについて簡単に紹介する。タンパク質の表面とその近傍の水分子を考える (図 4.1)。表面近傍の水分子は、溶質と水素結合している。さらにその水分子は、外側の水分子とも相互作用している (図 4.1 の真ん中)。ここで、コスモトロープがタンパク質の表面近傍に存在する場合を考える (図 4.1 の上部)。コスモトロープは、イオンの周囲の水分子に強い静電力を及ぼし、水分子の向きを変えて強く束縛する。これにより図 4.1 の矢印部分の水素結合が切れて、水和層内の水素結合の数は減少する。Collins は、コスモトロープはイオンの周囲の水を強く束縛するので、タンパク質の表面近傍のコスモトロープはタンパク質の水和水を奪うとも述べている。これによってタンパク質の水和は弱まり、タンパク質と溶媒との接触表面積を減らそうとする。表面積が小さくなろうとすることにより、タンパク質分子は凝集・沈殿したり、タンパク質の立体構造が安定化する。すなわち、 $\text{pH} > \text{pI}$ の場合、コスモトロープにより、タンパク質の溶解度は減少し、安定性が向上する。逆に、カオトロ-

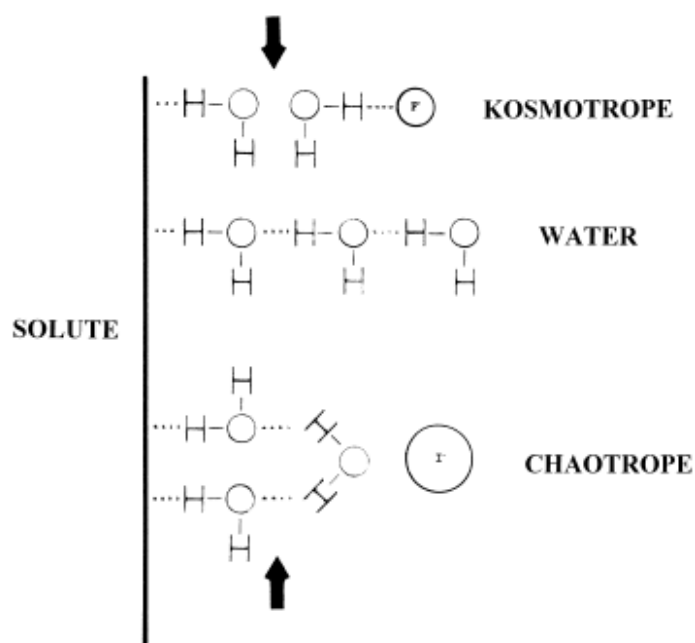


図 4.1. タンパク質の表面 (Solute) 近傍の水分子に塩が与える影響。この図は文献 [99] の図 9 からそのまま転載した。

がタンパク質の表面近傍に存在する場合を考える (図 4.1 の下部)。カオトロープは、イオンの周囲の水分子に及ぼす静電力が弱いので、バルク水とタンパク質の水和層内の水との間の水素結合を切り、水和層内の水同士の水素結合の数が増加する (図 4.1 の矢印部分)。Collins は、カオトロープはイオンの周囲の水を自由にするので、タンパク質の表面近傍のカオトロープはタンパク質の水和を助けるとも述べている。これによってタンパク質の水和は強まり、タンパク質と溶媒の接触表面積を増やそうとする。表面積が大きくなろうとすると、タンパク質分子は凝集・沈殿しにくくなり、変性しようとする。すなわち、 $\text{pH} > \text{pI}$ の場合、カオトロープにより、タンパク質の溶解度は増加し、安定性が低下する。以上が Collins の水和モデルである。

$\text{pH} < \text{pI}$ の場合、この水和モデルから得られる結論について考える。このモデルにおいて、タンパク質の水和層内における水素結合数の増減は、イオンと水との相互作用によって決まり、タンパク質の表面電荷の影響を受けないと考えられる。したがって、 $\text{pH} > \text{pI}$ の場合だけでなく、本研究において扱った $\text{pH} < \text{pI}$ の場合においても、このモデルによって導かれる結論は変わらないと考えられる。すなわち、 $\text{pH} < \text{pI}$ の場合においても、コスモトロープはタンパク質の水和層内の水素結合数を減らし、カオトロープは増やす。

ここで、カオトロープによる水和層内の水素結合数の増加は、水分子同士の結びつきが強まり、

表 4.1. コスモトロープおよびカオトロープによるタンパク質の表面近傍の水のダイナミクス、水素結合数、表面への水の選択的結合、表面張力への影響（イオンがこれらの量に与える影響は pH と pI の大小関係によらない。また、これらの量は相互に対応し、タンパク質の安定性に影響を与えると考えられる。）

イオン	ダイナミクス	水素結合数	選択的結合・排除	表面張力
コスモトロープ	速くする	減らす	選択的に結合する	大きくする
カオトロープ	遅くする	増やす	選択的に排除する	小さくする

個々の水分子は動きにくくなると考えられる。逆に、コスモトロープによる水和層内の水素結合数の減少は、水分子同士の結びつきが弱まり、個々の水分子は動きやすくなると考えられる。このことから、pH と pI の大小関係によらず、コスモトロープはタンパク質の表面近傍の水を動きやすくし、カオトロープは動きにくくすると考えられる。水分子の動きやすさは、水分子の動きの速さに対応すると考えられ、テラヘルツ分光により直接観測される量である。すなわち、イオンによる水和層内の水素結合数の増加は、テラヘルツ分光で観測される水分子のダイナミクスが遅いことに対応し、水和層内の水素結合数の減少は、テラヘルツ分光で観測される水分子のダイナミクスが速いことに対応する(表 4.1)。本研究では、コスモトロープがタンパク質の表面近傍の水の動きを速くし、カオトロープがタンパク質表面近傍の水の動きを遅くするという結果が得られた。テラヘルツ分光の結果は、Collins のモデルから導かれるタンパク質の表面近傍の水へのイオンの影響と一致する。

このモデルでは、コスモトロープは、バルク水に対しては水分子を動きにくくするはたらきがあるが、タンパク質の表面近傍の水に対しては動きやすくする。カオトロープは、バルク水に対しては水分子を動きやすくするが、タンパク質の表面近傍の水に対しては動きにくくする。すなわち、バルク水に対する塩の影響とタンパク質の表面近傍の水に対するイオンの影響は逆である。本研究では、バルク水に対するイオンの影響とタンパク質の表面近傍の水に対するイオンの影響は逆であるという結果が得られた。Collins の水和モデルを用いることで、本研究の結果を説明することができる。さらに、本実験では扱わなかったが、 $\text{pH} > \text{pI}$ の場合について、テラヘルツ分光を用いてタンパク質の表面近傍の水にイオンが与える影響を調べると、 $\text{pH} < \text{pI}$ の場合の結果と同

様に、コスモトロープがタンパク質の表面近傍の水の動きを速め、カオトロープは動きを遅くする結果が得られると予想する。

Collins のモデルで明らかになる水素結合数およびテラヘルツ分光で明らかになる水のダイナミクスとタンパク質の安定性・溶解度との関係について考える。Collins のモデルでは、コスモトロープは、タンパク質の水和層内における水素結合数を減少させ、タンパク質と溶媒との接触面積を小さくしようとする。これにより、タンパク質の溶解度は減少し、安定性は向上すると考えられる。pH>pI の場合は、Collins によって報告されているように、溶解度の低下と安定性の向上の両方を説明できる。しかし、pH<pI の場合は、コスモトロープによってタンパク質の安定性は向上するが、沈殿しにくくなる。したがって、Collins のモデルで明らかになる水素結合数を考えることで、タンパク質の安定性が向上することは説明できるが、タンパク質を沈殿させにくくすることは説明できない。カオトロープの場合にも同様の議論が可能である。すなわち、カオトロープは、タンパク質の水和層内における水素結合数を増加させ、タンパク質と溶媒との接触面積を大きくしようとする。これにより、タンパク質の溶解度は増加し、安定性が低下すると考えられる。pH>pI の場合は、Collins によって報告されているように、溶解度の上昇と安定性の低下の両方を説明できる。しかし、pH<pI の場合は、カオトロープによってタンパク質の安定性は低下するが、沈殿しやすくなる。したがって、水素結合数を考えることで、タンパク質の安定性が低下することは説明できるが、タンパク質を沈殿させやすくすることは説明できない。上で述べたように Collins のモデルで明らかになる水素結合数はテラヘルツ分光で明らかになる水のダイナミクスに対応することから、水のダイナミクスからも水素結合数による議論と同様の議論が可能である。以上より、Collins のモデルで明らかになる水和水層内の水素結合数やテラヘルツ分光で明らかになる水分子のダイナミクスは、タンパク質の安定性に寄与し、タンパク質の溶解度への寄与は小さいと考えられる。また、pH と pI の大小関係によってタンパク質の安定性に関する Hofmeister 系列が逆転しないことを説明できる。さらに、テラヘルツ分光ではピコ秒スケールの水のダイナミクスの情報が得られることから、本研究の結果は、タンパク質の水和水のピコ秒スケールのダイナミクスがタンパク質の安定性に関わっていることを示しているといえる。pH と pI の大小関係が変わるとタンパク質の溶解度に関する Hofmeister 系列が逆転することには、4.4 節で述べるように、タンパク質分子間の静電相互作用が寄与している。

4.3 選択的相互作用を調べる実験との比較

Arakawa と Timasheff [100] は、タンパク質の表面に塩と水がどの程度結合しやすいかを調べるために、タンパク質-塩混合水溶液の密度を測定している。得られた密度から選択的相互作用 (preferential interaction) パラメーター ξ_3 を計算している。 ξ_3 が大きいほどタンパク質表面に塩が結合しやすく、小さいほど結合しにくいことを意味する。この実験で明らかになるタンパク質表面への塩の結合は、塩の選択的結合と呼ばれる。塩の選択的結合とは、タンパク質を溶かしている塩水溶液 (溶媒) において、タンパク質表面の溶媒の塩濃度が、タンパク質の影響を受けていない部分の溶媒の塩濃度よりも高くなっている状態を指す。選択的結合の逆は塩の選択的排除であり、タンパク質表面の塩濃度が、タンパク質表面から十分離れた部分の溶媒の塩濃度よりも低くなっている状態を指す。彼らは、タンパク質表面への塩の選択的結合のしやすさから、タンパク質表面に選択的に結合する水について考察している。タンパク質表面に塩が選択的に結合する場合、結合した塩の分だけ水はタンパク質表面から排除される。すなわち、タンパク質表面への塩の結合によって、表面への水の結合量が減少する。逆に、タンパク質表面から塩が選択的に排除される場合、塩が排除されることでできる空間を水が埋める。すなわち、タンパク質表面からの塩の排除によって、表面への水の結合量が増加する。彼らの報告によれば、水溶液の pH とタンパク質の pI の大小関係によらず、コスモトロープはタンパク質表面に選択的に結合し、水は表面から選択的に排除される。また、pH と pI の大小関係によらず、カオトロープはタンパク質表面から選択的に排除され、その分を水が表面に選択的に結合する。強いカオトロープほどタンパク質表面に吸着しやすいことは、MD シミュレーション [101] や SFG 分光 [15] による研究の結果と一致している。

彼らは、この結果から、タンパク質の安定性と溶解度に塩が与える影響について次のように考察している。彼らは、 $\text{pH} > \text{pI}$ の場合の Hofmeister 系列について考えている。コスモトロープがタンパク質表面から排除されて表面に水が結合する場合、表面張力が大きくなる。表面張力が大きくなることによって、タンパク質の表面と溶媒との接触面積は小さくならうとする。接触面積が小さくならうとすることにより、タンパク質の溶解度は小さくなり、安定性は向上する。カオトロープがタンパク質表面に結合し水が表面から排除される場合、表面張力は小さくなる。表面張力が小さくなることによって、タンパク質の表面と溶媒との接触面積は大きくなろうとする。接触面積が大きくなろうとすることにより、タンパク質の溶解度は大きくなり、安定性は低下する。

以上により、 $\text{pH} > \text{pI}$ の場合について、タンパク質の溶解度と安定性は順 Hofmeister 系列に従う。

ここで、彼らの実験結果から、 $\text{pH} < \text{pI}$ の場合について考える。タンパク質表面へ強いカオトロープほど結合しやすいという彼らの実験結果は、 pH と pI の大小関係およびタンパク質の表面電荷の正負にはよらない。また、表面張力の変化も、塩の種類に依存し、 pH と pI の大小関係およびタンパク質の表面電荷の正負にはよらない。これらのことによれば、 $\text{pH} < \text{pI}$ の場合も、コスモトロープはタンパク質の溶解度を小さくし、安定性を向上させると考えられる。カオトロープは、 $\text{pH} < \text{pI}$ の場合も、タンパク質の溶解度を大きくし、安定性を低下させると考えられる。このうち、タンパク質の安定性についてみると、 pH と pI の大小関係によらず、コスモトロープはタンパク質を安定化し、カオトロープはタンパク質を不安定化するといえる。これは、実際にコスモトロープやカオトロープがタンパク質の安定性に与える影響と一致する。このことから、表面張力によって、タンパク質の安定性に対する Hofmeister 系列が逆転しないことを説明できる。また、タンパク質の溶解度についてみると、表面張力により予想されるタンパク質の溶解度へのコスモトロープやカオトロープの影響も、 pH と pI の大小関係によらない。しかし、タンパク質の溶解度に対する Hofmeister 系列は、現実には、 pH と pI の大小関係によって逆転する。すなわち、表面張力によって、タンパク質の溶解度への Hofmeister 系列が逆転することを説明できない。以上より、表面張力は、タンパク質の安定性には寄与するが、溶解度の変化への寄与は小さいと考えられる。

本研究の結果は、コスモトロープはリゾチーム表面近傍の水を動きを速くした。これにより、リゾチームは安定化する。また、カオトロープはリゾチーム表面近傍の水を動きを遅くした。これにより、リゾチームは不安定化する。コスモトロープがタンパク質を安定化し、カオトロープが不安定化することは、表面張力による議論から導かれる結論と一致する。本研究ではさらに、テラヘルツ分光で明らかになるタンパク質の表面近傍の水のダイナミクスは、タンパク質の安定性に寄与するが、溶解度の変化への寄与は小さいということを結論した。これは、表面張力がタンパク質の安定性に寄与するが、溶解度の変化への寄与は小さいことと類似する。このことから、表面張力とテラヘルツ分光により明らかになる水のダイナミクスとの間には次のような関係が成り立つと考えられる。表面張力が大きいとき、タンパク質の表面近傍の水分子は動きが速くなる。表面張力が小さいとき、タンパク質の表面近傍の水分子は動きが遅くなる (表 4.1)。

Arakawa と Timasheff は、表面張力という量を導入することで、実験結果から $\text{pH} > \text{pI}$ の場合のタンパク質の溶解度と安定性を議論している。一方、密度測定の結果得られる量は、タンパク質表面への塩および水の結合量である。そこで、タンパク質の表面への水の選択的結合量 (すなわ

ち、密度測定により明らかになるタンパク質の水和) からタンパク質の安定性について議論する。Arakawa らの報告によれば、コスモトロープは、pH と pI との大小関係によらず、タンパク質表面への水の選択的結合量を増やす。タンパク質表面に水が選択的に結合していることは、タンパク質表面が水になじみやすく、タンパク質と溶媒とが接触する面積は大きくなるとうと推測できる。しかし、表面張力による議論では、コスモトロープは、表面張力を大きくするので、タンパク質と溶媒との接触面積を小さくする。この矛盾は、タンパク質表面に水が選択的に結合することを、タンパク質と溶媒との接触面積が小さくなるとうとすることに対応づけることで解消できる。(水の選択的結合によって、タンパク質と溶媒との接触面積が大きくなるとうとすると仮定すると、コスモトロープがタンパク質を不安定にするという結論が導かれ、実験事実と一致しない。溶解度に関しては、 $\text{pH} < \text{pI}$ の場合のみ、実験事実と一致する。) カオトロープについても同様のことが言える。カオトロープは、pH と pI との大小関係によらず、水の選択的結合量を減らすと報告されている。タンパク質表面から水が選択的に排除されることは、タンパク質表面が水になじみにくく、タンパク質と溶媒とが接触する面積は小さくなるとうと推測できる。しかし、表面張力による議論では、カオトロープは、表面張力を小さくするので、タンパク質と溶媒との接触面積を大きくする。そこで、タンパク質表面から水が選択的に排除されることを、タンパク質と溶媒との接触面積を大きくしようとするとうとすることに対応づける。以上の対応づけにより、表面張力による議論のときと同様に、タンパク質表面への水の選択的結合からタンパク質の安定性と溶解度について議論できる。すなわち、pH と pI との大小関係によらず、コスモトロープはタンパク質を安定化し、カオトロープはタンパク質を不安定化することが導かれる。これは、pH と pI との大小関係によらず、タンパク質の安定性に関する Hofmeister 系列が逆転しないことと一致する。一方、タンパク質表面への水の選択的結合からは、タンパク質の溶解度に関する Hofmeister 系列が pH と pI との大小関係によって逆転することを説明できない。したがって、水の選択的結合は、上で述べた対応づけに基づけば、タンパク質の安定性に寄与し、溶解度の変化には寄与しないといえる。

上で述べた対応づけに基づいて、タンパク質表面への水の選択的結合とテラヘルツ分光により明らかになる水のダイナミクスとの関係を考えると、次のようになる(表 4.1)。コスモトロープは、タンパク質表面の水を選択的に結合し、タンパク質は安定化する。本研究の結果は、コスモトロープはリゾチーム表面近傍の水の動きを速くし、リゾチームを安定化した。このことから、タンパク質表面への水の選択的結合は、タンパク質の表面近傍の水のダイナミクスを速めることに対応

すると考えられる。一方、カオトロープは、タンパク質の表面から水を選択的に排除し、タンパク質を不安定化する。本研究の結果は、カオトロープはリゾチーム表面近傍の水の動きを遅くし、リゾチームを不安定化する結果であった。このことから、タンパク質表面からの水を選択的排除は、タンパク質の表面近傍の水のダイナミクスを遅くすることに対応すると考えられる。ここで、タンパク質表面への水を選択的結合量には、テラヘルツ分光で直接的に明らかになるダイナミクスの情報が含まれていないことに注意する。

タンパク質表面への水を選択的結合をタンパク質と溶媒との接触面積の減少に対応付けることは、一般的な想像からすると奇妙である。このような奇妙な対応付けをしなければならない原因のひとつに、選択的な水の結合量の求め方が考えられる。タンパク質表面への水を選択的結合量は、表面への塩の結合量から計算される。水を選択的結合量は、次のことを前提に計算される [102]。すなわち、塩がタンパク質表面に選択的に結合すると、その結合した塩の分だけ水が排除される。また、塩がタンパク質表面から選択的に排除されると、排除された分だけ水がタンパク質表面に結合する。しかし、タンパク質表面に塩が選択的に結合したときに、結合した塩の分だけ水が排除されている保障は無いと考える。また、タンパク質表面から選択的に塩が排除されたときに、その排除分を水が埋めずに水の密度が疎になる可能性もあると考える。これについては、今後、議論が必要であると考えられる。

4.4 和周波発生分光による結果との比較

S. C. Flores ら [15] は、モデル界面を用いて、界面近傍の水分子の配向の強さを和周波発生 (SFG) 分光により調べている。モデル界面には、塩水溶液と SiO_2 との界面および塩水溶液と TiO_2 との界面と塩水溶液との界面を用いており、これらを塩水溶液とタンパク質との界面に見立てている。 SiO_2 と pH 10.0 の塩水溶液を接触させることで、 SiO_2 の表面電荷は負となる。このとき $\text{pH} > \text{pI}$ であり、この系はタンパク質の溶解度と安定性が順 Hofmeister 系列に従う場合のモデルである。 TiO_2 と pH 2.3 の塩水溶液を接触させることで、 TiO_2 の表面電荷は正となる。このとき $\text{pH} < \text{pI}$ であり、この系は、タンパク質の溶解度が逆 Hofmeister 系列に従い、安定性が順 Hofmeister 系列に従う場合のモデルである。Flores らは、界面近傍の水分子の配向の強さから界面近傍でイオンの分布を導き、そこからタンパク質分子間にはたらく静電力を考えている。静電力による考察から、タンパク質の溶解度には静電相互作用が寄与していると結論している。

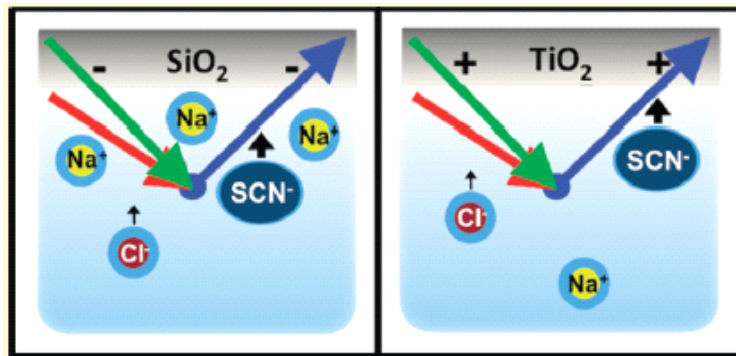


図 4.2. モデル界面における陰イオンと陽イオンの分布。左側が表面電荷が負 (SiO_2 界面、 $\text{pH} > \text{pI}$) の場合であり、右側が正 (TiO_2 界面、 $\text{pH} < \text{pI}$) の場合である。陽イオンとして Na^+ を、カオトロピックな陰イオンとして SCN^- を、 SCN^- よりもコスモトロピックな陰イオンとして Cl^- を描いている。この図は文献 [15] のアブストラクトからそのまま転載した。

帯電した表面と純水との界面では、表面の電荷によって表面付近に電場が生じ、その電場によって界面の水は配向する。Flores らの報告によれば、表面電荷が負 (SiO_2 界面、 $\text{pH} > \text{pI}$) の場合、塩水溶液中の陰イオンがカオトロピックであるほど、界面近傍の水分子の配向には影響を与えず、コスモトロピックな陰イオンほど、界面近傍の水分子の配向を弱める。また、表面電荷が正 (TiO_2 界面、 $\text{pH} < \text{pI}$) の場合、カオトロピックな陰イオンほど界面付近の水分子の配向を弱め、コスモトロピックな陰イオンほど水分子の配向には影響を与えないと報告されている。この水の配向の強さから、Flores らは界面近傍のイオンの分布を考察している。表面電荷が負 (SiO_2 界面、 $\text{pH} > \text{pI}$) の場合、陽イオンには界面との間で引力がはたらくので界面に近づく。陰イオンはカオトロピックな陰イオンほど界面に近づきやすい(図 4.2 の左側)。陰イオンがカオトロピックな場合ほど、界面に近づく陽イオンの電荷は陰イオンによって相殺され、表面の負電荷が活きる。これにより、カオトロピックな陰イオンほど、界面の水分子は配向を保持し、コスモトロピックな陰イオンほど水分子の配向を弱める。カオトロピックな陰イオンによって表面電荷が活きることにより、タンパク質分子間の静電反発力が小さくならない。したがって、タンパク質分子どうしは互いに近づくことができず凝集体や結晶を形成できないので、溶解度は低下しない。表面電荷が正 (TiO_2 界面、 $\text{pH} < \text{pI}$) の場合、陽イオンには界面との間に斥力がはたらくので界面から遠ざかる。陰イオンは、表面電荷が正の場合と同様に、カオトロピックな陰イオンほど界面に近づきやすい(図 4.2 の右側)。陰イオンがカオトロピックな場合ほど、界面の表面電荷が陰イオンによって相殺される。これにより、カオトロピックな陰イオンほど、界面の水分子は配向は弱まり、コスモトロピック

な陰イオンほど水分子の配向を保持する。カオトロピックな陰イオンによって表面電荷が相殺されることにより、タンパク質分子間の静電反発力が小さくなる。したがって、タンパク質分子どうしは互いに近づくことができ、凝集体や結晶を形成しやすくなるので、溶解度は減少する。以上により、Flores らは、タンパク質の溶解度には静電相互作用が寄与していると結論している。

タンパク質の安定性に関して、Flores らは言及していない。タンパク質の安定性についての議論ではタンパク質と溶媒とのなじみやすさについて考える必要があると考えられることから、タンパク質分子間の静電相互作用のみからタンパク質の安定性について議論することは難しいと考えられる。そこで、SFG 分光により直接明らかになる界面近傍における水分子の配向により、タンパク質の安定性および溶解度を議論する。表面電荷が負 (SiO_2 界面、 $\text{pH} > \text{pI}$) の場合、カオトロピックな陰イオンほど界面付近の水分子の配向の強さに影響を与えない。カオトロプほど水の配向の強さに影響を与えないことは、タンパク質表面と水との相互作用が強いままに保たれることと考えられる。タンパク質表面と水との相互作用が保持されることにより、タンパク質表面が水になじみやすくなり、タンパク質と溶媒とが接触する面積は大きくなろうとすると推測できる。これにより、カオトロピックな陰イオンにより、タンパク質は沈殿や結晶化しにくくなり、溶解度は増加すると考えられる。また、タンパク質は不安定になると考えられる。コスモトロピックな陰イオンは、界面近傍の水分子の配向を弱める。コスモトロプほど水の配向の強さを弱めることは、タンパク質表面と水との相互作用を弱める事と考えられる。相互作用が弱くなることにより、タンパク質表面が水になじみにくくなり、タンパク質と溶媒との接触面積が小さくなろうとすると推測できる。これにより、コスモトロピックな陰イオンにより、タンパク質は沈殿や結晶化しやすくなり、溶解度は低下すると考えられる。また、タンパク質は安定になると考えられる。以上のことは、表面電荷が負 (SiO_2 界面、 $\text{pH} > \text{pI}$) の場合におけるタンパク質の溶解度と安定性に関する Hofmeister 系列と一致する。表面電荷が正 (TiO_2 界面、 $\text{pH} < \text{pI}$) の場合、カオトロピックな陰イオンほど界面付近の水分子の配向の強さを弱める。カオトロプほど水の配向の強さを弱めることは、タンパク質の表面と水との相互作用を弱める事と考えられる。相互作用が弱まることにより、タンパク質表面が水になじみにくくなり、タンパク質と溶媒との接触面積を小さくなろうとすると推測できる。これにより、カオトロピックな陰イオンにより、タンパク質は沈殿や結晶化しやすくなり、溶解度は低下すると考えられる。タンパク質の安定性は、安定になると考えられる。しかし、実際には、タンパク質の溶解度は低下するが、タンパク質の安定性は不安定化する。コスモトロピックな陰イオンは、界面近傍の水分子の配向の強さに影響を与えない。コス

モトロープが配向の強さを保持することは、タンパク質の表面と水との相互作用が強いままに保たれることと考えられる。相互作用が強いままに保持されることにより、タンパク質表面が水になじみやすくなり、タンパク質と溶媒とが接触する面積は大きくなろうとすると推測できる。これにより、コスモトロピックな陰イオンにより、タンパク質は沈殿や結晶化しにくくなり、溶解度は増加すると考えられる。タンパク質の安定性は、不安定になると考えられる。しかし、実際には、タンパク質の溶解度は増加するが、タンパク質の安定性は安定化する。以上より、表面電荷が正 (TiO_2 界面、 $\text{pH} < \text{pI}$) の場合において、タンパク質の溶解度が逆 Hofmeister 系列に従うことを説明できるが、タンパク質の安定性が順 Hofmeister 系列に従うことを説明できない。したがって、SFG により明らかになる界面近傍の水分子の配向の強さは、タンパク質の溶解度に寄与するが、安定性への寄与は小さいと考えられる。

テラヘルツ分光で明らかになる水のダイナミクスは、タンパク質の安定性に寄与し、溶解度への寄与は小さいという結論であった。Collins の水和モデルで考えている水素結合の数や、密度測定により明らかになるタンパク質表面への水の選択的結合も同様に、タンパク質の安定性に寄与し、溶解度への寄与は小さいという結論であった。これは、SFG により明らかになる界面近傍の水分子の配向の強さからの結論とは異なる。したがって、水のダイナミクスの速い・遅い、水素結合数が増える・減る、および水が選択的に結合する・排除されることと、水分子の配向が強い・弱いとの間に、対応関係は存在しないと考えられる。タンパク質の溶解度には、界面近傍の水分子の配向およびタンパク質分子間の静電相互作用が関わっていると考えられる。一方、タンパク質の安定性には、タンパク質の表面近傍の水分子のダイナミクス、水素結合数、タンパク質表面への水の選択的結合量、表面張力が関わっていると考えられる。

4.5 タンパク質の安定性・溶解度と水和

はじめに、本研究で明らかになったタンパク質の表面近傍の水分子のダイナミクスに対する Hofmeister 系列に NH_4NO_3 だけが乗らなかったことについて言及する。 NH_4NO_3 は、タンパク質の溶解度に対する Hofmeister 系列では、カオトロープに分類される。SFG 分光 [15] や MD シミュレーション [101] の報告でも、 NH_4NO_3 はタンパク質表面に結合しやすいイオンとして報告されており、このことから NH_4NO_3 はカオトロープの性質を持っているといえる。しかし、タンパク質の表面近傍の水分子のダイナミクスに対しては、ダイナミクスを速めるようにはたらいだ。

ダイナミクスを速めるイオンは、これまでの考察から、コスモトロープである。これは、 NH_4NO_3 の持つ特異な性質であると考えられる。 NO_3^- には窒素原子が含まれており、タンパク質にも多く含まれている。 NO_3^- は本来コスモトロープであるが、窒素原子を含むことにより硫黄原子やリン原子を含むイオンよりも特異的にタンパク質表面に近づきやすいのではないかと想像する。そのため、タンパク質の溶解度に対する Hofmeister 系列では、カオトロープに分類されると想像する。このことに関しては、更なる研究が必要である。

つぎに、それぞれの手法の関係性とそれらにより明らかになる量の対応関係を整理する。Collins の水和モデルは、表面電荷が負 ($\text{pH} > \text{pI}$) の場合に対して考えられたモデルである。表面電荷が負のとき、彼のモデルの結論は、表面張力から考えられるタンパク質の安定性および溶解度と一致する。Arakawa らの選択的相互作用を調べる実験の結果からも、表面張力を考えることにより、同様の結論が得られる。したがって、Collins のモデルと選択的相互作用を調べる実験は、表面電荷が負の場合において、矛盾しない。Arakawa らの選択的相互作用を調べる実験では、表面電荷の正負によらず、カオトロープがタンパク質表面に選択的に結合しやすいという結果が得られている。SFG 分光においても、表面電荷の正負によらず、カオトロープほどタンパク質表面に近づきやすいと報告されている。したがって、選択的相互作用の実験と SFG 分光は矛盾しない。Collins のモデルと SFG とをつなぐ直接的な根拠はないが、以上のことから、三段論法的に Collins のモデルと SFG の実験は矛盾は無いと考えられる。また、Collins は、空気-塩水溶液界面における表面ポテンシャルの順序と符号の変わり目がタンパク質の溶解度と安定性の Hofmeister 系列と一致することを、彼のモデルの根拠の 1 つとしている。表面ポテンシャルは、界面付近に生じる電位差であり、SFG 分光により明らかになる界面付近の電場に対応する。負に帯電した界面付近の電場の向きは塩によって変わらない [86] が、電場の大きさの順序は Hofmeister 系列に一致する [15, 86]。

テラヘルツ分光で明らかになる水のダイナミクスは、タンパク質の安定性に寄与する。タンパク質の表面近傍の水のダイナミクスが速くなるとタンパク質は安定的になり、遅くなると不安定になる。タンパク質の界面近傍水のダイナミクスは、Collins の水和モデルで考えられている水和層内の水素結合の数と関連する量である。タンパク質の水和層内の水素結合数が減少するとタンパク質は安定的になり、増加すると不安定になる。密度測定により明らかになるタンパク質表面への塩の選択的結合・排除は、表面張力に関係する量であり、タンパク質の安定性に寄与する。塩の選択的排除は、表面張力を大きくし、タンパク質を安定にする。塩の選択的結合は、表面張力を小さくし、タンパク質を不安定にする。また、タンパク質表面への水の選択的結合・排除は、塩の

選択的結合量から計算される量であり、タンパク質の安定性に寄与する。水の選択的結合は、タンパク質を安定し、選択的排除は、タンパク質を不安定にする。SFG分光により明らかになる、表面近傍の水の配向は、タンパク質の溶解度と関係する量である。タンパク質の溶解度は、水の配向から導かれるタンパク質分子間の静電力によって説明できる。

Collins の水和モデルは、イオンがタンパク質表面の水和水を奪い合うか、水和を強めるような手助けをするかを考えているモデルである。従って、塩がタンパク質の水和に与える影響は、pH と pI の大小関係に依存しないと考えられる。タンパク質の沈殿のしやすさは、水溶液の pH とタンパク質の pI の大小関係により Hofmeister 系列が逆転する。一方、タンパク質の安定性に対する塩の影響は、pH と pI の関係によらず、順 Hofmeister 系列に従う [14]。Collins のモデルが pH と pI との大小関係によらないことは、安定性に対する Hofmeister 系列が pH と pI の大小関係によらないことに対応する。

テラヘルツ分光で明らかになるタンパク質の表面近傍における水のダイナミクス、Collins のモデルで明らかになるタンパク質の水和層内の水素結合数、密度測定から明らかになる水の選択的結合量、表面張力、SFG で明らかになる界面近傍の水分子の配向は、全て水和を調べることで明らかになる量である。本考察で明らかになったように、調べる手法と明らかになる量が異なると、対応するタンパク質の物性（溶解度・安定性）も異なる。表面電荷が負の場合だけを考えると、タンパク質の溶解度も安定性も順 Hofmeister 系列に従うことから、ひとつの量を考えることで溶解度も安定性も説明することができた。しかし、表面電荷が正の場合に議論を拡張しようとする、溶解度か安定性のどちらか一方を説明できない。さらに、様々な手法で明らかになる量は、水和しやすいかしくいか、水和が強いか弱いかというような、1つの概念的な尺度に当てはめて議論されることがしばしばあった。このような1つの概念的な尺度では、溶解度と安定性のどちらか一方は説明できるが、もう一方を完全に説明することはできない。したがって、水和には様々な側面があり、用いる手法によって明らかになる側面が異なり、それらを概念的な尺度に対応させて考えるべきではないと考えられる。

第5章 結論

塩がタンパク質の安定性に与える影響について調べるため、テラヘルツ時間領域分光法を用いて、塩がニワトリ卵白リゾチームの水和に与える影響を調べた。水溶液中のタンパク質の水和を精度良く観測するために、装置を高精度化した。レーザー強度の時間変化(揺らぎと強度の低下)によるテラヘルツ波の強度への影響を補正し、参照用セル透過波と試料セル透過波を交互に10回ずつ測定して平均することで、1 THzにおいて0.3% (純水の吸収係数 230 cm^{-1} に対してランダム誤差 0.6 cm^{-1}) の精度を実現した。レーザー強度は時間と共に弱まる傾向にあったことから、本実験では本来試料が持つ吸収係数よりも大きな値が観測される傾向にあると考えられる。これによる吸収係数の誤差は系統誤差としての性質が強いと考えられ、レーザー強度の時間変化がテラヘルツ波の強度に与える影響を補正することで、この誤差を 1 cm^{-1} 程度低減できた。

純水とリゾチーム 200 mg/mL 水溶液の吸収スペクトルから、それらの差スペクトル(水和の影響を含めたリゾチームの吸収)を計算した結果、差スペクトルは負になった。この結果は、リゾチームの水和水のダイナミクスがバルク水よりも遅くなっていることを示している。さらに、この差スペクトルは、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の添加により増加した。この結果は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ がタンパク質の表面近傍の水分子のダイナミクスを速めることを示している。得られた差スペクトルから、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ によるリゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスの変化を、リゾチームの水和数 N_{hyd} (リゾチーム分子1個あたりに水和している水分子の数)により評価した。その結果、 N_{hyd} は塩濃度 c_S (mol/L) の関数として、 $N_{\text{hyd}} = (182 \pm 30) - (201 \pm 130)c_S$ となった。

タンパク質の水和に対する Hofmeister 効果を調べるために、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に加え、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 NH_4SCN がタンパク質の水和に与える影響を調べた。その結果、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4NO_3 はリゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスを速め、 NH_4SCN はリゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスを遅くした。 NH_4Cl は表面近傍の水分子のダイナミクスに大きな影響を与えなかった。さらに、塩によるリゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスの変化を、リゾチームの水和数の変化率(塩 1 mol/L あたりの水和数の増減) a_{N_2} により評価

した。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 は水和数を減少させ、 NH_4SCN は水和数を増加させた。 a_{N_2} の大きい順に塩を並べると、 $\text{NH}_4\text{SCN} > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ となった。 NH_4NO_3 を除けば、水和水の量を増やす度合いは逆 Hofmeister 系列と一致した。コスモトロープほどリゾチームの表面近傍の水のダイナミクスを速め、カオトロープほど表面近傍の水のダイナミクスを遅くした。

コスモトロープは、バルク水に対しては水を動きにくくするが、本実験ではタンパク質の表面近傍の水に対しては動きやすくすることが明らかになった。一方、カオトロープは、バルク水に対しては水を動きやすくするが、本実験ではタンパク質の水和水に対しては動きにくくすることが明らかになった。この結果は、Collins によって提案された水和モデル [99] によって説明できる。コスモトロープは、水の構造を強め、周囲の水分子に強い静電力を及ぼすことから、タンパク質の水和層内において水の水素結合ネットワークを破壊する。水素結合ネットワークの破壊は、テラヘルツ分光で明らかになる水のダイナミクスが速まることに対応する。カオトロープは、水の構造を弱め、周囲の水分子に及ぼす静電力が弱いことから、タンパク質の水和層内において水の水素結合ネットワークを形成する。水素結合ネットワークの形成は、テラヘルツ分光で明らかになる水のダイナミクスが遅くなることに対応する。Collins の水和モデルは、タンパク質水溶液の pH がタンパク質の等電点 pI よりも大きい ($\text{pH} > \text{pI}$) 場合について考えられたモデルであるが、このモデルは、タンパク質水溶液の pH とタンパク質の pI の大小関係によらないと考えられる。本研究により明らかになった、塩がリゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスに与える影響は Collins の水和モデルに一致した。

本研究で明らかになった、塩がリゾチームの表面近傍の水分子のダイナミクスに与える影響と Collins の水和モデルから、タンパク質の表面近傍における水分子のダイナミクスと水素結合ネットワークは、タンパク質の安定性に対する Hofmeister 系列とこの系列が pH と pI の大小関係によって逆転しないことを説明できる。同様に、密度測定により明らかになるタンパク質表面への水の選択的結合・排除量や溶媒の表面張力も、タンパク質の安定性に対する Hofmeister 系列とこの系列が pH と pI の大小関係によって逆転しないことを説明できる。したがって、水のダイナミクス、水素結合ネットワーク、水の選択的結合・排除、および表面張力は、タンパク質の安定性に寄与し、タンパク質の溶解度への寄与は小さいと考えられる。一方、SFG 分光により明らかになるタンパク質の表面における水分子の配向は、タンパク質の溶解度に対する Hofmeister 系列とこの系列が pH と pI の大小関係によって逆転することを説明できる。したがって、この水分子の配

向はタンパク質の溶解度に寄与し、タンパク質の安定性への寄与は小さいと考えられる。

本研究の結果は、テラヘルツ分光により明らかになる、タンパク質の表面近傍の水分子のピコ秒スケールのダイナミクスがタンパク質の安定性に関わっていることを強く示唆している。タンパク質の水和に対する塩の影響をピコ秒の時間スケールでかつ直接的な観測手法により調べることは、ホフマイスター系列を分子レベルで理解するうえで重要な知見となると期待する。さらに本考察では、調べる手法と明らかになる量が異なると、説明できるタンパク質の物性（溶解度・安定性）が異なることを明らかにした。表面電荷が負の場合だけを考えて、タンパク質の溶解度も安定性も順 Hofmeister 系列に従うことから、ひとつの量を考えることで溶解度も安定性も説明することができた。しかし、表面電荷が正の場合に議論を拡張しようとする、溶解度か安定性のどちらか一方を説明できない。また、様々な手法で明らかになる量は、水和しやすいかしくないか、水和が強いか弱いかというような、1つの概念的な尺度に当てはめて議論されることがしばしばあった。このような1つの概念的な尺度では、溶解度や安定性のどちらか一方は説明できても、もう一方を完全に説明することはできない。したがって、水和には様々な側面があり、用いる手法によって明らかになる側面が異なり、それらを概念的な尺度に対応させて考えるべきではないと考える。

謝辞

本研究は、服部 利明 教授と白木 賢太郎 准教授の指導のもとで行われた。服部教授には、実験テーマの立ち上げからの全ての過程において常に的確なアドバイスをしていただいた。白木准教授には、研究を進めるに当たり、多くの有益な提案をしていただいた。さらに、白木研究室のゼミや朝輪読にも参加させて頂き、タンパク質を測定試料とする研究を進める上で必要な知識を身につける良い機会を与えていただいた。両氏の指導に対して心から感謝する。

加納 英明 准教授には、様々な建設的な議論や提案をしていただいた。長谷 宗明 准教授には、実験装置に関する技術的な相談に乗っていただいた。これらのことに対して、深く感謝したい。

白木研究室の平野 篤 氏、富田 峻介 氏、高井 英輔 氏、吉川 弘樹 氏、栗之丸 隆章 氏、嘉部井 航平 氏、山本 智恵 氏、田中 智恵 氏、志喜屋 惟 氏、篠崎 大将 氏、神山 有里 氏、島田 万里 氏、田邊 裕美子 氏、井上 直人 氏、大橋 凱 氏、吉澤 俊祐 氏、丸山 卓也 氏、岩下 和輝 氏、桑田 賢吾 氏、松田 あゆみ 氏、宮武 拓未 氏には、白木研究室の実験装置を使う際に様々なサポートをしていただいた。特に、吉川氏と田中氏には、タンパク質の取り扱いをはじめとする技術的なサポートと実験結果の議論をしていただいた。白木研究室の皆さんには、他研究室の私に同じ研究室のメンバーのように接していただいた。心から感謝したい。

服部・加納研究室では、井口 和博 氏、玉積 英明 氏、公文 光 氏、田中 大二朗 氏、Kaveh Delfanazari 氏、平松 光太郎 氏、瀬川 尋貴 氏、坂田 圭 氏、桂 佑輔 氏、Guang-Yi Mu 氏、畑 隆介 氏、伏見 知紘 氏、西村 知恵 氏、浅野 智顕 氏、小野 貴大 氏、堀田 英輝 氏、兼安 惇哉 氏、秋山 敏宏 氏、石塚 圭 氏、米山 弘亮 氏、生沼 良樹 氏、郡司 謙汰 氏、長谷川 響一 氏、矢野 かおり 氏、大野 智哉 氏、下平 雄貴 氏と多くの時間を共にし、様々な場面で支えていただいた。心から感謝したい。特に、西村氏には、実験装置の改良に尽力していただいたことに対して、井口氏と玉積氏には、先輩として多くのことを教えていただいたことに対して深く感謝したい。

最後に、これまでの研究生活を常に支えてくれた家族に感謝したい。

引用文献

- [1] D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry, 4th ed.* (John Wiley & Sons, 2010).
- [2] J. D. Bernal and R. H. Fowler, “A theory of water and ionic solution, with particular reference to hydrogen and hydroxyl ions,” *J. Chem. Phys.* **1**, 515–548 (1933).
- [3] 大滝仁志, *溶液化学* (裳華房, 1985).
- [4] U. Heugen, G. Schwaab, E. Bründermann, M. Heyden, X. Yu, D. M. Leitner, and M. Havenith, “Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 12301–12306 (2006).
- [5] R. J. P. Williams, “The conformation properties of proteins in solution,” *Biol. Rev.* **54**, 389–437 (1979).
- [6] O. Y. Samoilov, “A new approach to the study of hydration of ions in aqueous solutions,” *Discuss. Faraday Soc.* **24**, 141–146 (1957).
- [7] H. S. Frank and W.-Y. Wen, “Structural aspects of ion-solvent interaction in aqueous solutions: A suggested picture of water structure,” *Discuss. Faraday Soc.* **24**, 133–140 (1957).
- [8] 有坂文雄, *バイオサイエンスのための蛋白質化学入門* (裳華房, 2004).
- [9] F. Hofmeister, “Zur Lehre von der Wirkung der Salze,” *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **24**, 247–260 (1888).
- [10] W. Kunz, J. Henle, and B. W. Ninham, “‘ Zur Lehre von der Wirkung der Salze ’ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister ’ s historical papers,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **9**, 19–37 (2004).

- [11] Y. Zhang and P. S. Cremer, “Interactions between macromolecules and ions: the hofmeister series,” *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 658–663 (2006).
- [12] K. Aoki and J. Hori, “Precipitation of bovine serum albumin by thiocyanate ion,” *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 75–79 (1962).
- [13] M. M. Ries-Kautt and A. F. Ducruix, “Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme,” *J. Biol. Chem.* **264**, 745–748 (1989).
- [14] J. W. Bye and R. J. Falconer, “Thermal stability of lysozyme as a function of ion concentration: A reappraisal of the relationship between the hofmeister series and protein stability,” *Protien Sci.* **22**, 1563–1570 (2013).
- [15] S. C. Flores, J. Kherb, and P. S. Cremer, “Direct and reverse Hofmeister effects on interfacial water structure,” *J. Phys. Chem. C* **116**, 14408–14413 (2012).
- [16] D. I. Svergun, S. Richard, M. H. J. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin, and G. Zaccai, “Protein hydration in solution: Experimental observation by x-ray and neutron scattering,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2267–2272 (1998).
- [17] B. Halle, “Protein hydration dynamics in solution: a critical survey,” *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **359**, 1207–1224 (2004).
- [18] B. Halle and V. P. Denisov, “Magnetic relaxation dispersion studies of biomolecular solutions,” *Methods Enzymol.* **338**, 178–201 (2002).
- [19] G. Otting, “NMR studies of water bound to biological molecules,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **31**, 259–285 (1997).
- [20] K. Tompa, P. Bánki, M. Bokor, P. Kamasa, G. Lasanda, and P. Tompa, “Interfacial water at protein surfaces: Wide-line NMR and DSC characterization of hydration in ubiquitin solutions,” *Biophys. J.* **96**, 2789–2798 (2009).
- [21] H. Yada, M. Nagai, and K. Tanaka, “Origin of the fast relaxation component of water and heavy water revealed by terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy,” *Chem. Phys. Lett.* **464**, 166–170 (2008).

- [22] M. Heyden and M. Havenith, “Combining THz spectroscopy and MD simulations to study protein-hydration coupling,” *Methods* **52**, 74–83 (2010).
- [23] V. C. Nibali and M. Havenith, “New insights into the role of water in biological function: Studying solvated biomolecules using terahertz absorption spectroscopy in conjunction with molecular dynamics simulations,” *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12800–12807 (2014).
- [24] U. Kaatzte, “The dielectric properties of water in its different states of interaction,” *J. Solution Chem.* **26**, 1049–1112 (1997).
- [25] U. Kaatzte, “Complex permittivity of water as a function of frequency and temperature,” *J. Chem. Eng. Data* **34**, 371–374 (1989).
- [26] J. M. Alison and R. J. Sheppard, “A precision waveguide system for the measurement of complex permittivity of lossy liquids and solid tissues in the frequency range 29 GHz to 90 GHz-III. the liquid system for 57 to 82 GHz: an investigation into water and formamide,” *Meas. Sci. Technol.* **2**, 975–979 (1991).
- [27] R. Buchner, S. G. Capewell, G. Hefter, and P. M. May, “Ion-pair and solvent relaxation processes in aqueous Na_2SO_4 solutions,” *J. Phys. Chem. B* **103**, 1185–1192 (1999).
- [28] R. Buchner, G. Hefter, P. M. May, and P. Sipos, “Dielectric relaxation of dilute aqueous NaOH , $\text{NaAl}(\text{OH})_4$, and $\text{NaB}(\text{OH})_4$,” *J. Phys. Chem. B* **103**, 11186–11190 (1999).
- [29] R. Buchner, G. T. Hefter, and P. M. May, “Dielectric relaxation of aqueous NaCl solutions,” *J. Phys. Chem. A* **103**, 1–9 (1999).
- [30] W. Wachter, Š. Fernandez, and R. Buchner, “Ion association and hydration in aqueous solutions of LiCl and Li_2SO_4 by dielectric spectroscopy,” *J. Phys. Chem. B* **111**, 9010–9017 (2007).
- [31] W. Wachter, W. Kunz, R. Buchner, and G. Hefter, “Is there an anionic hofmeister effect on water dynamics? dielectric spectroscopy of aqueous solutions of NaBr , NaI , NaNO_3 , NaClO_4 , and NaSCN ,” *J. Phys. Chem. A* **109**, 8675–8683 (2005).

- [32] R. Buchner, T. Chen, and G. Hefter, “Complexity in “simple” electrolyte solutions: Ion pairing in $\text{MgSO}_4(\text{aq})$,” *J. Phys. Chem. B* **108**, 2365–2375 (2004).
- [33] T. Chen, G. Hefter, and R. Buchner, “Dielectric spectroscopy of aqueous solutions of KCl and CsCl,” *J. Phys. Chem. A* **107**, 4025–4031 (2003).
- [34] T. Miyazaki, G. Mogami, T. Wazawa, T. Kodama, and M. Suzuki, “Measurement of the dielectric relaxation property of water-ion loose complex in aqueous solutions of salt at low concentrations,” *J. Phys. Chem. A* **112**, 10801–10806 (2008).
- [35] G. H. Haggis, J. B. Hasted, and T. J. Buchanan, “The dielectric properties of water in solutions,” *J. Chem. Phys.* **20**, 1452–1465 (1952).
- [36] K. Yokoyama, T. Kamei, H. Minami, and M. Suzuki, “Hydration study of globular proteins by microwave dielectric spectroscopy,” *J. Phys. Chem. B* **105**, 12622–12627 (2001).
- [37] C. Cametti, S. Marchetti, C. Gambi, and G. Onori, “Dielectric relaxation spectroscopy of lysozyme aqueous solutions: Analysis of the δ -dispersion and the contribution of the hydration water,” *J. Phys. Chem. B* **115**, 7144–7153 (2011).
- [38] B. E. Pennock and H. P. Schwan, “Further observations on the electrical properties of hemoglobin-bound water,” *J. Phys. Chem.* **73**, 2600–2610 (1969).
- [39] M. Suzuki, J. Shigematsu, and T. Kodama, “Hydration study of proteins in solution by microwave dielectric analysis,” *J. Phys. Chem.* **100**, 7279–7282 (1996).
- [40] A. Oleinikova, P. Sasisanker, and H. Weingärtner, “What can really be learned from dielectric spectroscopy of protein solutions? A case study of ribonuclease A,” *J. Phys. Chem. B* **108**, 8467–8474 (2004).
- [41] E. Dachwitz, F. Parak, and M. Stockhausen, “On the dielectric relaxation of aqueous mioglobin solution,” *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **93**, 1454–1458 (1989).
- [42] L. Thrane, R. H. Jacobsen, P. U. Jepsen, and S. R. Keiding, “THz reflection spectroscopy of liquid water,” *Chem. Phys. Lett.* **240**, 330–333 (1995).

- [43] C. Rønne, P.-O. Åstrand, and S. R. Keiding, “THz spectroscopy of liquid H₂O and D₂O,” *Phys. Rev. Lett.* **82**, 2888–2891 (1999).
- [44] C. Rønne, L. Thrane, P.-O. Åstrand, A. Wallqvist, K. V. Mikkelsen, and S. R. Keiding, “Investigation of the temperature dependence of dielectric relaxation in liquid water by THz reflection spectroscopy and molecular dynamics simulation,” *J. Chem. Phys.* **107**, 5319–5331 (1997).
- [45] C. Rønne and S. R. Keiding, “Low frequency spectroscopy of liquid water using THz-time domain spectroscopy,” *J. Mol. Liquids* **101**, 199–218 (2002).
- [46] M. Nagai, H. Yada, T. Arikawa, and K. Tanaka, “Terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy in water and biological solution,” *Int. J. Infrared Millimeter Waves* **27**, 505–515 (2006).
- [47] A. Bergner, U. Heugen, E. Bründermann, G. Schwaab, M. Havenith, D. R. Chamberlin, and E. E. Haller, “New p-Ge THz laser spectrometer for the study of solutions: THz absorption spectroscopy of water,” *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 063110 (2005).
- [48] J. T. Kindt and C. A. Schmuttenmaer, “Far-infrared dielectric properties of polar liquids probed by femtosecond terahertz pulse spectroscopy,” *J. Phys. Chem.* **100**, 10373–10379 (1996).
- [49] M. N. Afsar and J. B. Hasted, “Measurements of the optical constants of liquid H₂O and D₂O between 6 and 450 cm⁻¹,” *J. Opt. Soc. Am.* **67**, 902–904 (1977).
- [50] A. G. Markelz, A. Roitberg, and E. J. Heilweil, “Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz,” *Chem. Phys. Lett.* **320**, 42–48 (2000).
- [51] D. F. Plusquellic, K. Siegrist, E. J. Heilweil, and O. Esenturk, “Applications of terahertz spectroscopy in biosystems,” *Chem. Phys. Chem.* **8**, 2412–2431 (2007).
- [52] K. N. Woods, “Solvent-induced backbone fluctuations and the collective librational dynamics of lysozyme studied by terahertz spectroscopy,” *Phys. Rev. E* **81**, 031915 (2010).

- [53] J. R. Knab, J.-Y. Chen, Y. He, and A. G. Markelz, “Terahertz measurements of protein relaxational dynamics,” *Proc. of IEEE* **95**, 1605–1610 (2007).
- [54] A. Markelz, S. Whitmire, J. Hillebrecht, and R. Birge, “Thz time domain spectroscopy of biomolecular conformational modes,” *Phys. Med. Biol.* **47**, 3797–3805 (2002).
- [55] J. Knab, J.-Y. Chen, and A. Markelz, “Hydration dependence of conformational dielectric relaxation of lysozyme,” *Biophys. J.* **90**, 2576–2581 (2006).
- [56] R. Liu, M. He, R. Su, Y. Yu, W. Qi, and Z. He, “Insulin amyloid fibrillation studied by terahertz spectroscopy and other biophysical methods,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 862–867 (2010).
- [57] G. M. Png, R. J. Falconer, B. M. Fischer, H. A. Zakaria, S. P. Mickan, A. P. Middelberg, and D. Abbott, “Terahertz spectroscopic differentiation of microstructures in protein gels,” *Opt. Express* **17**, 13102–13115 (2009).
- [58] H. A. Zakaria, B. M. Fischer, A. P. Bradley, I. Jones, D. Abbott, A. P. J. Middelberg, and R. J. Falconer, “Low-frequency spectroscopic analysis of monomeric and fibrillar lysozyme,” *Appl. Spectrosc.* **65**, 260–264 (2011).
- [59] T. Globus, T. Khromova, R. Lobo, D. Woolard, N. Swami, and E. Fernandez, “THz characterization of lysozyme at different conformation,” *Proc. of SPIE* **5790**, 54–65 (2005).
- [60] J. Xu, K. W. Plaxco, and S. J. Allen, “Probing the collective vibrational dynamics of a protein in liquid water by terahertz absorption spectroscopy,” *Protein Sci.* **15**, 1175–1181 (2006).
- [61] J. Xu, K. W. Plaxco, and S. J. Allen, “Collective dynamics of lysozyme in water: Terahertz absorption spectroscopy and comparison with theory,” *J. Phys. Chem. B* **110**, 24255–24269 (2006).
- [62] S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, U. Heugen, M. Gruebele, D. M. Leitner, and M. Havenith, “An extended dynamical hydration shell around proteins,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 20749–20752 (2007).

- [63] S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, M. Gruebele, D. M. Leitner, and M. Havenith, "Protein sequence- and pH-dependent hydration probed by terahertz spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 2374–2375 (2008).
- [64] E. Castro-Camus and M. B. Johnston, "Conformational changes of photoactive yellow protein monitored by terahertz spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.* **455**, 289–292 (2008).
- [65] J. W. Bye, S. Meliga, D. Ferachou, G. Cinque, J. A. Zeitler, and R. J. Falconer, "Analysis of the hydration water around bovine serum albumin using terahertz coherent synchrotron radiation," *J. Phys. Chem. A* **118**, 83–88 (2014).
- [66] B. Born, S. J. Kim, S. Ebbinghaus, M. Gruebele, and M. Havenith, "The terahertz dance of water with the proteins: the effect of protein flexibility on the dynamical hydration shell of ubiquitin," *Faraday Discuss.* **141**, 161–173 (2009).
- [67] K. Meister, S. Ebbinghaus, Y. Xu, J. G. Duman, A. DeVries, M. Gruebele, D. M. Leitner, and M. Havenith, "Long-range protein-water dynamics in hyperactive insect antifreeze proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 1617–1622 (2013).
- [68] S. Ebbinghaus, K. Meister, B. Born, A. L. DeVries, M. Gruebele, and M. Havenith, "Antifreeze glycoprotein activity correlates with long-range protein-water dynamics," *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12210–12211 (2010).
- [69] T. Arikawa, M. Nagai, and K. Tanaka, "Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.* **457**, 12–17 (2008).
- [70] M. Hishida and K. Tanaka, "Long-range hydration effect of lipid membrane studied by terahertz time-domain spectroscopy," *Phys. Rev. Lett.* **106**, 158102 (2011).
- [71] H. Naito, Y. Ogawa, H. Hoshina, S. Sultana, and N. Kondo, "Analysis of intermolecular interaction of poly(N-isopropylacrylamide) solution with attenuated total reflectance terahertz spectroscopy," *Appl. Phys. Lett.* **100**, 191102 (2012).

- [72] P. U. Jepsen and H. Merbold, “Terahertz reflection spectroscopy of aqueous NaCl and LiCl solutions,” *J. Infrared Milli. Terahz. Waves* **31**, 430–440 (2010).
- [73] J. Xu, K. W. Plaxco, S. J. Allen, J. E. Bjarnason, and E. R. Brown, “0.15–3.72 THz absorption of aqueous salts and saline solutions,” *Appl. Phys. Lett.* **90**, 031908 (2007).
- [74] K. J. Tielrooij, N. Garcia-Araez, M. Bonn, and H. J. Bakker, “Cooperativity in ion hydration,” *Science* **328**, 1006–1009 (2010).
- [75] K. J. Tielrooij, R. L. A. Timmer, H. J. Bakker, and M. Bonn, “Structure dynamics of the proton in liquidwater probed with terahertz time-domain spectroscopy,” *Phys. Rev. Lett.* **102**, 198303 (2009).
- [76] K. J. Tielrooij, S. T. van der Post, J. Hunger, M. Bonn, and H. J. Bakker, “Anisotropic water reorientation around ions,” *J. Phys. Chem. B* **115**, 12638–12647 (2011).
- [77] J. Hunger, L. Liu, K.-J. Tielrooij, M. Bonn, and H. Bakker, “Vibrational and orientational dynamics of water in aqueous hydroxide solutions,” *J. Chem. Phys.* **135**, 124517 (2011).
- [78] S. Funkner, G. Niehues, D. A. Schmidt, M. Heyden, G. Schwaab, K. M. Callahan, D. J. Tobias, and M. Havenith, “Watching the low-frequency motions in aqueous salt solutions: The terahertz vibrational signatures of hydrated ions,” *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1030–1035 (2012).
- [79] J. Xu, K. W. Plaxco, and S. J. Allen, “Absorption spectra of liquid water and aqueous buffers between 0.3 and 3.72 THz,” *J. Chem. Phys.* **124**, 036101 (2006).
- [80] D. A. Schmidt, Ö. Birer, S. Funkner, B. P. Born, R. Gnanasekaran, G. W. Schwaab, D. M. Leitner, and M. Havenith, “Rattling in the cage: Ions as probes of sub-picosecond water network dynamics,” *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18512–18517 (2009).
- [81] V. Sharma, F. Böhm, M. Seitz, G. Schwaab, and M. Havenith, “From solvated ions to ion-pairing: a THz study of lanthanum(III) hydration,” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 8383–8391 (2013).

- [82] M. Kondoh, Y. Ohshima, and M. Tsubouchi, “Ion effects on the structure of water studied by terahertz time-domain spectroscopy,” *Chem. Phys. Lett.* **591**, 317–322 (2014).
- [83] S. Woutersen, U. Emmerichs, and H. J. Bakker, “Femtosecond mid-IR pump-probe spectroscopy of liquid water: Evidence for a two-component structure,” *Science* **278**, 658–660 (1997).
- [84] 服部利明, *非線形光学入門* (裳華房, 2009).
- [85] K. Mazur, I. A. Heisler, and S. R. Meech, “Water dynamics at protein interfaces: Ultrafast optical Kerr effect study,” *J. Phys. Chem. A* **116**, 2678–2685 (2012).
- [86] S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, and T. Tahara, “Counterion effect on interfacial water at charged interfaces and its relevance to the Hofmeister series,” *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 6155–6158 (2014).
- [87] C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma, “Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution,” *Nature* **206**, 757–761 (1965).
- [88] A. Dong, P. Huang, and W. S. Caughey, “Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra,” *Biochemistry* **29**, 3303–3308 (1990).
- [89] R. Adomavičius, A. Urbanowicz, G. Molis, A. Krotkus, and E. Šatkovskis, “Terahertz emission from p-InAs due to the instantaneous polarization,” *Appl. Phys. Lett.* **85**, 2463–2465 (2004).
- [90] J. Z. Xu and X.-C. Zhang, “Optical rectification in an area with a diameter comparable to or smaller than the center wavelength of terahertz radiation,” *Opt. Lett.* **27**, 1067–1069 (2002).
- [91] M. Naftaly and R. Dudley, “Terahertz reflectivities of metal-coated mirrors,” *Appl. Opt.* **50**, 3201–3204 (2011).
- [92] 齋藤雄一, *テラヘルツ時間領域分光システムの構築と分光実験* (筑波大学大学院博士前期課程数理物質科学研究科 修士論文, 2008).

- [93] M. Reid and R. Fedosejevs, “Terahertz birefringence and attenuation properties of wood and paper,” *Appl. Opt.* **45**, 2766–2772 (2006).
- [94] C. Zhang, E. Tarhan, A. K. Ramdas, A. M. Weiner, and S. M. Durbin, “Broadened far-infrared absorption spectra for hydrated and dehydrated myoglobin,” *J. Phys. Chem. B* **108**, 10077–10082 (2004).
- [95] N. Q. Vinh, S. J. Allen, and K. W. Plaxco, “Dielectric spectroscopy of proteins as a quantitative experimental test of computational models of their low-frequency harmonic motions,” *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8942–8947 (2011).
- [96] F. Sterpone, G. Stirnemann, and D. Laage, “Magnitude and molecular origin of water slowdown next to a protein,” *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4116–4119 (2012).
- [97] M. Marchi, F. Sterpone, and M. Ceccarelli, “Water rotational relaxation and diffusion in hydrated lysozyme,” *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6787–6791 (2002).
- [98] S. Perticaroli, L. Comez, M. Paolantoni, P. Sassi, L. Lupi, D. Fioretto, A. Paciaroni, and A. Morresi, “Broadband depolarized light scattering study of diluted protein aqueous solutions,” *J. Phys. Chem. B* **114**, 8262–8269 (2010).
- [99] K. D. Collins, “Ions from the hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process,” *Methods* **34**, 300–311 (2004).
- [100] T. Arakawa and S. N. Timasheff, “Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: Balance between hydration and salt binding,” *Biochemistry* **23**, 5912–5923 (1984).
- [101] J. Paterová, K. B. Rembert, J. Heyda, Y. Kurra, H. I. Okur, W. R. Liu, C. Hilty, P. S. Cremer, and P. Jungwirth, “Reversal of the hofmeister series: Specific ion effects on peptides,” *J. Phys. Chem. B* **117**, 8150–8158 (2013).
- [102] J. C. Lee, K. Gekko, and S. N. Timasheff, “Measurements of preferential solvent interactions by densimetric techniques,” *Methods Enzymol.* **61**, 26–49 (1979).