

視物質ロドプシンにおけるオプシンシフトと 光異性化反応の理論的研究

中村, 知洋 / NAKAMURA, Tomohiro

(発行年 / Year)

2006-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2006-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2005 年度 修士論文

視物質ロドプシンにおける
オプシンシフトと光異性化反応の理論的研究

Theoretical investigation of opsin shift
and photoisomerization of visual pigment rhodopsin

指導教授 片岡洋右 教授

法政大学大学院工学研究科
物質化学専攻修士課程

04R2122 中村 知洋

目次

1. はじめに	3
2. 緒論	4
3. 理論	5
3.1 分子軌道法の概要	5
3.2 分子軌道法の種類	14
3.2.1 ab initio 分子軌道法	14
3.2.2 半経験的分子軌道法	15
3.3 一電子励起配置間相互作用法	16
3.4 CIS 計算で考慮する分子軌道数	17
3.5 構造最適化	18
4. MOPAC	19
4.1 MOPAC 概要	19
4.2 入力データの作成	21
4.2.1 データセット	21
4.2.2 Z-matrix の指定	21
4.2.3 対称性の表示	22
5. ロドプシンとレチナール	23
5.1 ロドプシン	23
5.2 レチナール	24
6. オプシンシフト	25
7. 光異性化反応	26
8. 計算方法	27
9. 実験結果および考察	28
9.1 レチナール単体の cis 体と trans 体のエネルギー	28
9.2 ねじれ角に対するポテンシャルエネルギー面	31

9.3	1,2-ジフルオロエチレンの光異性化	32
9.4	レチナールの光異性化の際の構造変化モデル	34
9.5	プロトン化シッフベースによる吸収波長への影響	40
9.6	共役鎖のねじれによる吸収波長への影響	42
9.7	アミノ酸による吸収波長への影響	44
9.8	カウンターイオンの吸収波長への影響	60
10.	結論	61
11.	参考文献	62
12.	謝辞	63

1. はじめに

分子軌道法を用いた分子の物性・反応性の理論的解析は、その重要性は指摘されながら実験を専門としている研究者にはあまり利用されてこなかった。これは、分子軌道計算の適用可能な分子の大きさが、実際の実験で用いている分子と大きくかけはなれていたことや、取り扱いの簡単なプログラムがなかったこと、大型計算機の使用量の高さが原因であった。しかしながら最近では、これらの問題はほぼ解決している。

半経験的分子軌道計算では MOPAC、非経験的分子軌道計算では GAUSSIAN や HONDO 等のユーザーフレンドリーなプログラムが開発され、市販されている。これらのプログラムは、分子構造の情報を入力するだけで、安定構造や反応性指数等の情報を容易に与える。また、安価なワークステーションやパソコンでさえその性能は数年前の大型計算機のそれに匹敵し、それらを用いた分子モデリングソフトが開発されている。そのため、Mackintosh や Windows パソコンのグラフィカルなインターフェイスを用いて、半経験的・非経験的分子軌道計算を行うことが可能で、従来考えられなかった手軽さで実験結果の理論的解析を行うことができる。このような状況を有効に利用するために、分子軌道計算と実験結果を組み合わせる研究を行う方法についての知識が不可欠となりつつある。

2. 緒論

生物は様々な形で光を利用している。太陽光線のエネルギーを化学エネルギーに変換する光合成、光を利用して外界の情報を取り入れる光感覚、光による形態形成の調節、など枚挙に暇がない。生物における光受容初期過程は光受容分子の光励起、あるいは光励起に伴う分子の形態変化、光受容分子系における光エネルギー移動、光エネルギーの捕捉、光酸化還元過程における電子移動などの諸過程からなっている。これらはすべて量子力学的過程である。したがって、生物と光の関わりの本質を理解するためには、量子力学的取り扱いが不可欠である。分子による光の吸収とその後の反応を追跡するためには、分子の励起状態を正しく記述しなければならない。

生物が光を感じる時、光受容の初期過程は視細胞に存在する視物質ロドプシン中のレチナール分子の *cis-trans* 光異性化反応が担っている。

そこで、本実験では光受容の初期過程を司る重要なタンパク質であるロドプシンの発色団（光吸収物質）レチナールに関して分子軌道計算を行うことにより、オブシンシフトと光異性化反応について量子化学的に検討する。

3. 理論

3.1 分子軌道法の概要

以下に、分子軌道法に関する基礎的な事項を列挙する。

- (1) 分子内の電子の挙動を(1電子)分子軌道関数で記述する。分子軌道関数は1個の電子の位置座標(と時間)の関数である。Mullikenの提言に従って、分子軌道関数のことを略して「分子軌道」という。電子はスピンを持っているから、そのスピン状態をスピン関数またはスピン関数で表す。分子軌道とスピン関数の積を「スピン軌道」と呼ぶことにする。

- (2) Pauliの排他率を考慮すると、「1個の分子軌道によって、スピンとスピンの状態にある2個の電子を記述することができる」。慣用的な表現として、各分子軌道にスピンを逆平行にして2個ずつ電子を“つめる”などともいう。2n個の電子のつまり具合を絵にしたのが、Fig.1である。今、仮に2n個の電子に番号を付けて、Fig.1の電子配置に対応する全電子波動関数を書いてみると、例えば次のようなHartree積と呼ばれる波動関数が書ける。

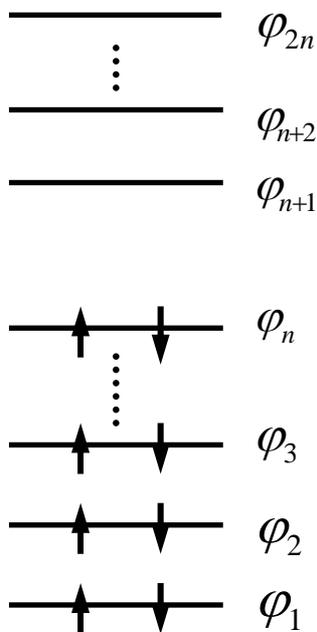


Fig.1 電子配置

$$\varphi_1(1)\alpha(1) \cdot \varphi_1(2)\beta(2) \cdot \varphi_2(3)\alpha(3) \cdot \varphi_2(4)\beta(4) \cdots \varphi_n(2n)\beta(2n) \quad (1.1)$$

電子を入れ換えると全部で(2n)!通りの Hartree 積が書けるが、2n 個の電子は物理的には同じ電子であって区別できないから、これら(2n)!の Hartree 積のすべてを対等に扱って分子の電子状態を記述する必要がある。そこで、Fig.1 の電子配置に対応する全電子波動関数を Ψ として、次のような Slater 行列式を採用することにする。

$$\Psi(1,2,\dots,2n) = \frac{1}{\sqrt{(2n)!}} \begin{vmatrix} \varphi_1(1)\alpha(1) & \varphi_1(1)\beta(1) & \varphi_2(1)\alpha(1) & \cdots & \varphi_n(1)\beta(1) \\ \varphi_1(2)\alpha(2) & \varphi_1(2)\beta(2) & \varphi_2(2)\alpha(2) & \cdots & \varphi_n(2)\beta(2) \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots \\ \varphi_1(2n)\alpha(2n) & \varphi_1(2n)\beta(2n) & \varphi_2(2n)\alpha(2n) & \cdots & \varphi_n(2n)\beta(2n) \end{vmatrix} \quad (1.2)$$

$$= \frac{1}{\sqrt{(2n)!}} \sum_P (-1)^P \hat{P} \{ \varphi_1(1)\alpha(1)\varphi_1(2)\beta(2) \cdots \varphi_n(2n)\beta(2n) \} \quad (1.3)$$

ただし、 \hat{P} は順列 1,2,...,2n の交換(Permutation)を表す演算子で、P はその交換の回数である。上式は対角項だけを表示して次式のように略記することが多い。

$$\Psi(1,2,\dots,2n) = |\varphi_1(1)\alpha(1)\varphi_1(2)\beta(2) \cdots \varphi_n(2n)\beta(2n)| \quad (1.4)$$

Slater 行列式は行列式であるから Pauli の排他率の要請どおり、2 個の電子の交換に対して反対称性を示す。また、展開してみればわかるように、(2n)!個の Hartree 積で表される状態の重ね合わせとして表現されている。

- (3) Slater 行列式を構成している n 個の 1 電子分子軌道 i は適当な数の原子軌道 μ の一次結合で近似する。

$$\varphi_i = \sum_{\mu=1}^m \chi_{\mu} C_{\mu i} \quad (\text{LCAO近似}) \quad (1.5)$$

これを、LCAO(Linear Combination Of Atomic Orbitals)近似という。
 係数の組 $\{C_{\mu i}\}$ は、各分子軌道 i が互いに直交しているという条件($S_{ij} = \delta_{ij}$)のもとで、全電子エネルギー E の期待値 が極小値をとるように Lagrange の未定乗数法を使って定める。この方法は Schrödinger 方程式

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1.6)$$

を解くことと同等である。

- (4) 全電子のエネルギー を計算するとき、電子にくれべて圧倒的に重い原子の核は、電子の運動を考える際には、じっとその平衡位置に滞っているものとする(Born-Oppenheimer の近似)
- (5) Slater 行列式 Ψ を用いて全電子エネルギー の表式をもとめると

$$\varepsilon = \int \Psi^* H \Psi d\tau \quad (1.7)$$

$$= 2 \sum_{i=1}^n H_{ii} + \sum_i \sum_j (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (1.8)$$

となる。 H_{ii} 、 J_{ij} 、 K_{ij} は、それぞれ分子軌道 i 、 j で表したコア積分(“ 電子の運動エネルギー ” と “ 電子と殻(=Core)との静電エネルギー ” の和)、(2 電子)クーロン積分、(2 電子)交換積分である。 K_{ij} が現れるのは、Pauli の排他率を適用することによってパラレルスピン間の相関を考慮に入れたからである。

- (6) H_{ii} 、 J_{ij} 、 K_{ij} 、および S_{ij} を(1.5)式を用いて原子軌道の組 $\{\chi_{\mu}\}$ の表式に改め、直行規格化条件($S_{ij} = \delta_{ij}$)を束縛条件とする Lagrange の未定乗数法を実行する。すなわち、各 $C_{\mu i}$ を変数とみたとて、

$$G = \varepsilon - 2 \sum_i \sum_j \varepsilon_{ji} (S_{ij} - \delta_{ij}) = \varepsilon - 2 \sum_i \varepsilon_i (S_{ii} - 1) \quad (1.9)$$

の変分 δG を 0 に置く。未定乗数 ε_i は、後に分子軌道 i のエネルギー準位、つまり 1 電子軌道エネルギーであることが分かる。

- (7) m 個の基底関数 $\{ \varphi_\mu \}$ の一次結合で表した n 個の分子軌道 $\{ \psi_i \}$ を用いて $2n$ 電子系の Slater 行列式を作った場合、上記の Lagrange の未定乗数法を実行すると、 n 組の m 元一次連立方程式

$$\sum_{\nu=1}^m (F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) C_{\nu i} = 0 \quad \left(\begin{array}{l} i=1,2,\dots,n \text{ に対して} \\ \mu=1,2,\dots,m \text{ で } m \text{ 本} \end{array} \right) \quad (1.10)$$

に到達する。この式を正準形の「Hartree-Fock-Roothaan の式」という。

ここに、 $F_{\mu\nu}$ は Fock 行列要素と呼ばれるもので、 $S_{\mu\nu}$ は原子軌道の重なり積分である。

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} + \sum_{\lambda} \sum_{\sigma} P_{\lambda\sigma} \left[(\mu\nu | \lambda\sigma) - \frac{1}{2} (\mu\sigma | \lambda\nu) \right] \quad (1.11)$$

ただし、

$$H_{\mu\nu} = \int x_{\mu} \hat{h} x_{\nu} d\tau \quad (\text{コア積分}) \quad (1.12)$$

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_j^n C_{\lambda j} C_{\sigma j} \quad (\text{結合次数 } Bond \text{ order})(1.13)$$

$$(\mu\nu | \lambda\sigma) = \int x_{\mu}(1)x_{\nu}(1) \frac{1}{r_{12}} x_{\lambda}(2)x_{\sigma}(2) d\tau$$

(2電子反発積分) (1.14)

$$S_{\mu\nu} = \int x_{\mu} x_{\nu} d\tau \quad (\text{重なり積分}) \quad (1.15)$$

よく教科書には、(1.10)式の C_{vi} を変数と見たてて、その係数からなる永年行列式=0 として n 個の i を求めておき、分子軌道に関する規格化条件を利用して各 $\{C_{vi}\}$ を求める方法が載っている。しかし、コンピューターを使って解く時は、次に述べるようにして、行列の形の固有方程式に還元してから解く。

- (8) n 組の(1.10)式を全部書き下しておいて行列の形にまとめると、

結局、分子軌道をもとめるには

$$\begin{cases} FC = SC\varepsilon_D & (\text{Hartree - Fock - Roothaanの式}) & (1.20) \\ C^T SC = I & (\text{分子軌道間の直交規格化条件}) & (1.21) \end{cases}$$

を連立させて解けばいいことになる。

ここで、 F は $\{F_{\mu\nu}\}$ を要素とする Fock 行列、 C は固有ベクトル行列、 S は重なり積分の行列、 ε_D は固有値行列である。 ε_D は行列の対角項は各 i に対応するエネルギー準位 (=1 電子軌道エネルギー) であり、 C 行列を見るとその各 i に対応する LCAO 係数 $\{C_{\mu i}\}$ が縦に 1 列に並んでいることに注意して欲しい。 F 行列は実数からなる対称行列なので、固有値 ε_i はすべて実数となり、 C 行列も実数行列となる。

- (9) 拡張ヒュッケル法以外の半経験的分子軌道法、例えば MOPAC に入っている MINDO/3 法、AM1 法、PM3 法などでは、すべて「Zero Differential Overlap (ZDO) の近似」を採用している。これは被積分関数に、 μ と ν が異なる $\chi_{\mu}(1) \chi_{\nu}(1)$ の形の積、すなわち Differential Overlap (微分重なり) が出てきたら、有無を言わずそれを 0 としてしまう近似であり、重なり積分 $S_{\mu\nu}$ に関していえば $S_{\mu\nu} = \delta_{\mu\nu}$ 、したがって $S=1$ となる。結局 (1.20), (1.21) 式は

$$\begin{cases} FC = C\varepsilon_D & (1.22) \\ CTC = I & (1.23) \end{cases}$$

と書ける。この二つの連立式が、半経験的分子軌道法において最終的に解くべき方程式なのである。

- (10) (1.22) 式は固有方程式の形をしている。両方に左から C の逆行列 C^{-1} をかけると

$$\begin{aligned} C^{-1}FC &= C^{-1}C\varepsilon_D \\ \therefore C^{-1}FC &= \varepsilon_D \end{aligned} \quad (1.24)$$

となる。(1.23) 式の直交規格化条件 $C^T C (= C^{-1} C) = I$ を考えると、(1.24) 式

は、「与えられた F 行列を直交変換行列を用いて対角化してやると、対角化に用いた直交変換行列として C、対角化された行列として ϵ_D が一挙に求まる」ことを意味している。

コンピューターで半経験的分子軌道法を解くときは、F 行列を組み立てて、その対角化によって、エネルギー固有値の行列 ϵ_D と、LCAO 係数の行列 C とを同時に求めているのである。

- (11) 実際には、F 行列要素 $F_{\mu\nu}$ を決めるためには、予め結合次数 $P_{\lambda\sigma}$ の値が必要である。その $P_{\lambda\sigma}$ の計算に必要な $\{C_{\mu i}\}$ の値は、実は F 行列の対角比の結果として求まる値なので、初めに適当な $\{C_{\mu i}\}$ を初期値として仮定して F 行列を作っておいて、仮定した $\{C_{\mu i}\}$ と対角比の結果として求めた $\{C_{\mu i}\}$ とが許容範囲内で一致するようになるまで、繰り返し計算を行う必要がある。この操作を iterative に SCF 解 (Self-Consistent Field での解) を求めるという。

- (12) 半経験的分子軌道法における、分子構造の最適化 (Geometry Optimization) と、分子軌道の形とエネルギー固有値を SCF 的に求める対角化の計算プロセスは次のとおりである。

適当に分子の初期構造を仮定する。

(適当に) LCAO 係数 $\{C_{\mu i}\}$ を仮定する。

$F_{\mu\nu}$ を計算して F 行列を作る。

F 行列を対角化する。

$$\epsilon_D = C^{-1}FC$$

これで ϵ_D と C が求まる。

で仮定した $\{C_{\mu i}\}$ と、で求めた $\{C_{\mu i}\}$ の差が許容範囲内かどうかを調べる。

・許容範囲外ならば に戻り、今回求めた $\{C_{\mu i}\}$ をもとに新しい $F_{\mu\nu}$ を作る (iteration 続行)。

・許容範囲内ならば SCF になったので へ進む。

分子構造が収束したか？

収束した 終了

収束しない エネルギーの一次微分として各原子に働く力を求めて、力の方向に原子を動かす。 へ戻る。

(13) 求まった分子軌道

$$\varphi_i = C_{1i}\chi_1 + C_{2i}\chi_2 + C_{3i}\chi_3 \cdots + C_{mi}\chi_m \quad (1.25)$$

における各係数の 2 乗は、その原子軌道の属する原子のまわりの電子密度への寄与を表す。

$$\begin{cases} C_{\mu i} C_{\nu i} S_{\mu\nu} > 0 \rightarrow \mu, \nu \text{ 間は結合性} \\ C_{\mu i} C_{\nu i} S_{\mu\nu} < 0 \rightarrow \mu, \nu \text{ 間は反結合性} \end{cases}$$

3.2 分子軌道法の種類

分子軌道法は ab initio 分子軌道法と半経験的分子軌道法に大別できる。MOPAC は半経験的分子軌道法のプログラムパッケージである。小さな分子はむしろ ab initio 分子軌道法による計算を行ったほうがよいので、ここでは両者を概観しておくことにする。

3.2.1 ab initio 分子軌道法

この方法では Hartree-Fock-Roothaan の式を「初めから(ab initio)」できるだけ近似しないで解く。

長所は、a)使用する基底関数(Basis set)および計算方法、例えば、HF レベルの計算ですますか、あるいは CI(電子配置間相互作用)とか、MP(Møller Plesset)摂動法のレベルまで計算するか、に応じた精度が期待できる、b)結合距離で ± 0.01 、挟角 $\pm 1 \sim 2^\circ$ 、二面角 $\pm 5 \sim 10^\circ$ の精度で構造が求まる、などである。

短所としては、a)構造は HF レベルの計算でほぼ満足できるが、エネルギー、電荷分布(双極子モーメント)などは電子相関の計算(CI や MP 摂動法)が必要となり、長い計算時間と大きなディスクメモリーが必要であること、b)精度のよい計算は水素原子以外の原子(重原子という)が 5 個くらいでできている分子に限られること、などが挙げられる。

ab initio 法による計算を行う場合は、基底関数の選択、例えば STO-3G、3-21G、6-31G、分極関数の追加(lone-pair 電子がある場合)、diffuse 関数の追加(電気陰性度大きい原子やアニオンの場合)や、計算方法の選択、例えば HF 計算か電子相関を考慮するか(SD-CI、MP2、MP3、MP4)に留意する必要がある。

3.2.2 半経験的分子軌道法

半経験的分子軌道法では、 $S=I$ の近似と、各種パラメーターを使って計算した積分値とを用いて、(1.22)、(1.23)式を解く。

長所は、a)大きな分子の計算ができる、b)計算が早い、c)ab initio 法と違って、電子相関の効果は用いるパラメーターを通して自動的に取り込まれている、などであり、短所は、計算結果のすべてはパラメーター次第であり、パラメーターの決定時に考慮されなかった分子群に属する分子を新たに計算した場合には正しい結果が得られるという保証がないことである。しかし、それでも有用な結果が得られるので、計算化学では多用されている。

3.3 一電子励起配置間相互作用法

(Configuration Interaction Singles ; CIS)

MOS F では励起状態の計算を行う際に、基底状態の占有軌道の 1 個の電子が、空の軌道へ励起した一電子励起配置のみを考慮する CIS 法を採用している。

この方法では、Hartree-Fock 解を基底状態として、そこからの一電子励起配置の線形結合を用いて励起状態を近似的に表現する。

Fig.2 において、基底状態の電子配置を(a)とすると、励起状態の電子配置はひとつの電子配置で表すことはできず、(b)、(c)、(d)のような複数の励起電子配置が混在する形になる。つまり、真の電子状態はこれら複数の励起電子配置をすべて考慮しなければならないことになる。そこで、複数の一電子励起配置の線形結合を励起状態を近似的に表現する方法である、一電子励起配置間相互作用法が必要となる。

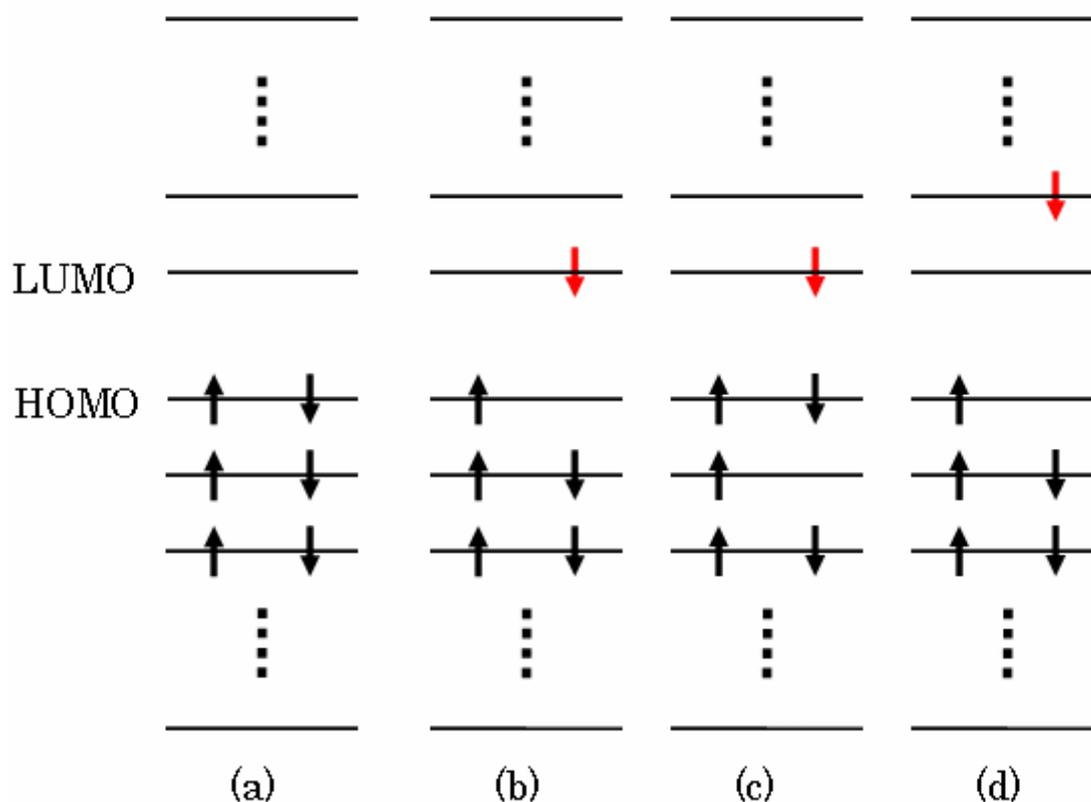


Fig.2 吸収波長計算で考慮する電子配置

3.4 CIS 計算で考慮する分子軌道数

MOS-F では CIS 計算で使用する分子軌道を制限している。その理由は、1) 制限した CIS 計算でも、励起状態が合うようにパラメータが設定されている。2) CIS 計算で考慮する被占分子軌道数が増えるとそれだけ必要なメモリも多くなるため制限せざるを得ない。ということが考えられる。

そこで、本研究では多くの興味ある吸収は $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移によるものであると考え、全ての π 軌道、 π^* 軌道を含むように分子軌道数を決定することにする。また、各分子軌道が π 軌道的かそうでないかは、MOPAC の分子軌道描画機能をもちいて判断する。

エチレンの最高被占有軌道 HOMO、および最低空軌道 LUMO の図を Fig.3 に示す。これらの軌道は見て分かる通り、結合軸に対して垂直にひろがっているので π 軌道、 π^* 軌道であると判断することができる。このように全ての分子軌道について π 軌道的かそうでないかを判断することにする。

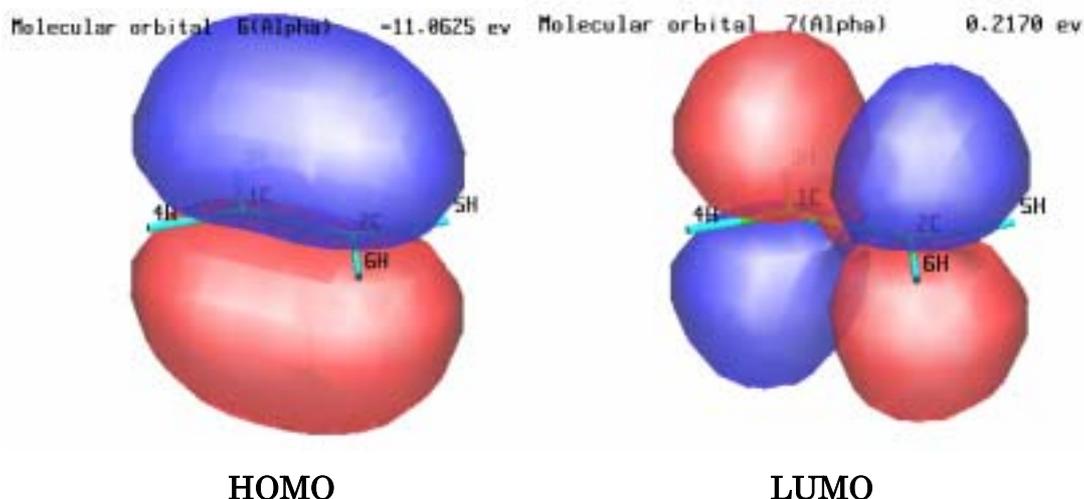


Fig.3 エチレンの HOMO と LUMO

3.5 構造最適化

構造最適化とは分子の平衡構造を決定することであり、分子のエネルギーのポテンシャル面における極小点を探すことである。

極小値探査には分子の各原子核座標毎にエネルギー勾配を求め、エネルギーが小さくなる向きに（勾配が負の方向に）原子核を移動させる。ポテンシャル面は原子核の数だけの次元を持ち、分子数の大きな系の最適化は計算コストも大きく一般に困難であった。そこで本研究では密度汎関数法によるエネルギー勾配を利用したタンパク質及びペプチド鎖の構造最適化システムを開発した。構造最適化はタンパク質の初期構造から計算を始める。与えられた構造におけるエネルギー勾配を求め、エネルギー勾配に沿ってエネルギーを極小にするように原子核の位置を移動させる。エネルギー勾配が一定の値以下になるまで原子核の移動を繰り返す。このようにしてエネルギーが極小となるタンパク質の構造を得ることができる。

構造最適化は大きく2つの機能からなり、1つはエネルギー勾配を求める機能、もう1つは求められたエネルギー勾配を利用してエネルギー極小値を探査する最適化機能である。

4. MOPAC

4.1 MOPAC 概要

MOPAC は改良が続けられ現在では様々な近似法(ハミルトニアン)がある。その中でも代表的な MNDO、AM1、PM3 についての精度を Table.1 に示す。また、簡単な分子について PM3、AM1、ab initio の各計算値と実測値の比較を Table.2 に示す。

MOPAC では、分子の作成は Work Space 上で画面をクリックすることで視覚的に行うことができる。また、実際の計算もキーワードを指定することで行うことができる。キーワードは全部で 150 以上あるが、ここでは代表的なキーワードのみを Table.3 に示す。

Table 1 実験値との比較

分子	結合距離/ 結合角/度	実験値	PM3	AM1	GAUSSIAN
エタン	C-C	1.531	1.5044	1.5002	1.527
	C-H	1.096	1.0977	1.1171	1.086
	H-C-H	107.2	107.22	108.19	107.7
エチレン	C-C	1.339	1.3219	1.3259	1.317
	C-H	1.085	1.0860	1.0982	1.076
	H-C-H	117.8	113.80	114.56	116.4
アセチレン	C-C	1.203	1.1898	1.1954	1.185
	C-H	1.061	1.0644	1.0605	1.057
H ₂ C=O	C=O	1.208	1.2021	1.2273	1.184
	H-C-H	116.5	121.79	122.22	115.7

Table 2 各種化合物の生成熱(kcal/mol)の平均誤差

化合物の型	化合物数	誤差の絶対値平均			誤差の自乗平均		
		PM3	MNDO	AM1	PM3	MNDO	AM1
含水素	456.0	6.2	12.8	7.3	8.3	24.2	10.4
含炭素	459.0	6.2	12.8	7.9	8.7	23.1	11.5
含窒素	117.0	6.5	18.8	9.6	8.3	27.0	12.5
含酸素	234.0	9.0	32.4	14.4	12.9	56.4	25.2
含フッ素	133.0	8.6	44.4	22.7	11.2	84.2	49.5
含ケイ素	78.0	10.1	22.4	14.5	14.2	32.9	20.8
含リン	70.0	12.4	37.7	19.5	16.1	55.6	29.1
含硫黄	101.0	12.0	50.3	23.4	16.2	79.8	34.0
含塩素	93.0	9.6	24.6	18.8	13.4	54.1	37.8
含臭素	67.0	11.4	27.8	23.4	15.5	46.5	39.9
含ヨウ素	73.0	10.7	29.2	25.7	15.8	60.7	53.5
C,H,N,O よりな る化合物	276.0	5.5	11.2	7.5	7.9	18.5	10.5
含ニトロ基	29.0	5.2	39.6	15.7	6.2	44.1	18.5
有機リン(V) 化合物	15.0	10.9	53.9	15.5	14.3	56.7	17.3
通常化合物	607.0	7.3	13.1	9.6	11.2	24.3	14.8
ハイパーバレ ント化合物	106.0	13.6	75.8	37.7	17.3	104.5	62.3
上記全化合物	713.0	8.2	22.5	13.8	11.6	46.2	27.6

Table 3 MOPAC の代表的なキーワード

キーワード	計算の内容	キーワードの説明
PM3	計算方法	計算に PM3 法を用いる
CNDO/S	計算方法	計算に CNDO/S 法を用いる
XYZ	計算方法	計算に XYZ 座標を用いる
CIS	計算条件	一電子励起 CI 計算を行う
CI(m n)	計算条件	CI 計算で考慮する分子軌道を、非占軌道についてエネルギーの高いものから m 個、空軌道についてエネルギーの低いものから n 個とする
CHARGE=n	計算条件	系全体の電荷を n として計算を行う
EF	構造最適化	EF 法を用いて構造を最適化する
TS	遷移状態の最適化	EF 法を用いて遷移状態の構造最適化を行う
SADDLE	遷移状態の探索	原系と生成系から遷移状態の構造を探索する
FORCE	分子振動の計算	分子振動の計算を行う
IRC	IRC 計算	固有反応座標の計算を行う
PRECISE	計算精度	収束条件を 100 倍厳しくする

4.2 入力データの作成

4.2.1 データセット

MOPAC では、分子の入力形式として

- 1) 直交座標表示(通常の XYZ 座標)
- 2) 内部座標表示(Z-matrix 座標)

の 2 種類があるが、直交座標表示では原子間の結合関係が指定できないため、一般的には 2)を用いて入力座標とする。

一般的な入力データを以下に示す。

```
Line 1: キーワード入力行
Line 2: タイトルまたはコメント入力行
Line 3: タイトルまたはコメント入力行
Line 4: Z-matrix 入力行
Line 5:      :
Line 6:      :
Line 7:      :
Line 8:      :
Line 9: Z-matrix 入力行
Line 10: 空行または "0"
Line 11: 対称性データ
Line 12: 対称性データ
Line 13: 空行または "0"
```

4.2.2 Z-matrix の指定

ある原子 A を指定するのに、次のパラメーターをこの順に指定する。

原子	結合距離	フラグ	結合角	フラグ	二面体角	フラグ	N1	N2	N3
A	1.1	1	120.	1	180.	0	1	2	3

原子	指定する原子 A の元素記号または原子番号を入力
結合距離	A と N1 の距離()

フラグ	結合距離、結合角、二面体角の各パラメーターを最適化する(1)か否(0)かを示すフラグまたは、反応座標を指定する際は、-1を指定。ただし、これは Z-matrix 内で 1 回のみ使用可能。
結合角	A - N1 - N2 の結合角(degree)
二面体角	二面体角 A - N1 - N2 - N3 を指定する。3 原子以上の直線分子はダミー原子を用いて二面体角を指定する。
N1、N2、N3	上記パラメーター指定のため原子 N1、N2、N3 を示す。ただし、すでに指定されている原子またはダミー原子を指定する。

4.2.3 対称性の表示

Line11 と Line12 は対称性を示す行である。これはキーワード“ SYMMETRY ”を指定したときのみ必要となるものである。一般的に、“ SYMMETRY ”の指定により計算時間の短縮を図ることが多いので、この対称性表示も必要となることが多くなると考えられる。

一般的な表示法は以下の通りである。

(基準となる原子)(対称関係)(定義される原子)(定義される原子)...

原子はすべて内部座標表示で示された番号にて指定される。
また、対称関係は下に示した数値で表される。

- 対称関係
- 1: 結合距離が等しい
 - 2: 結合角が等しい
 - 3: 二面体角が等しい
 - 8: 二面体角は 180 度からそれを引くと等しい
 - 14: 二面体角に負をつけると等しい

5. ロドプシンとレチナール

5.1 ロドプシン

ロドプシンは脊椎動物の目の網膜内の桿体細胞に存在するタンパク質であり、光の明暗を識別する光受容体であり、視覚における光センサーとしての役割を果たしている。

ロドプシンの分子量は約 40000 のタンパク質で、7回膜貫通型ヘリックスのアミノ酸部分（オプシン）と、Lys296 との結合を介して光を吸収する部分であるレチナール発色団から成る。この時、レチナール分子は必ず 11 位の部分で cis 体となっている。X線結晶構造解析[1]から得られたロドプシンの構造を Fig.4 に示す。



Fig.4 ロドプシンの構造

5.2 レチナール

レチナールは イオン環と共役鎖から成り、視細胞において可視部の光を吸収する発色団（光吸収物質）としての役割を担っている。レチナールはビタミン A の誘導体であり、実際にビタミン A（レチノール）から作られる。レチナールの分子構造を Fig.5 に示す。また、ビタミン A と、その前駆体である β -カロテンの分子構造を Fig.6 に示す。

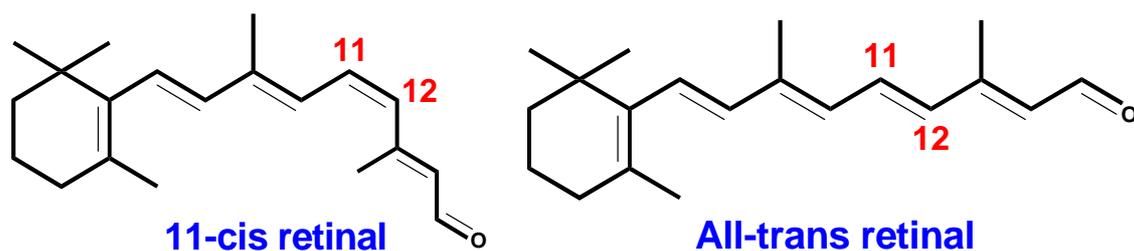
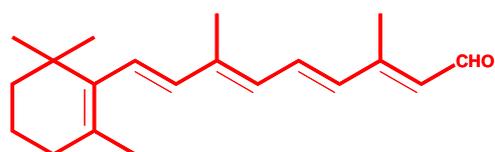
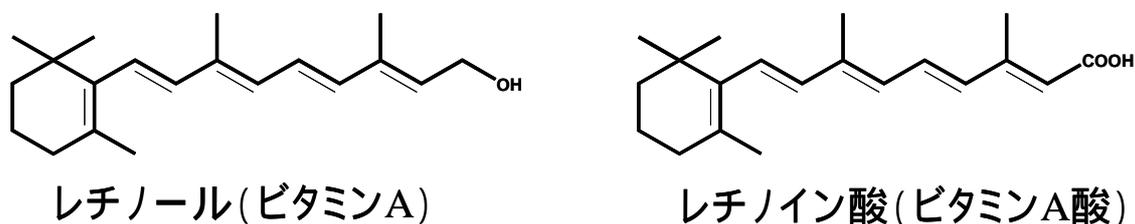


Fig.5 レチナールの構造



レチナール(ビタミンAアルデヒド)

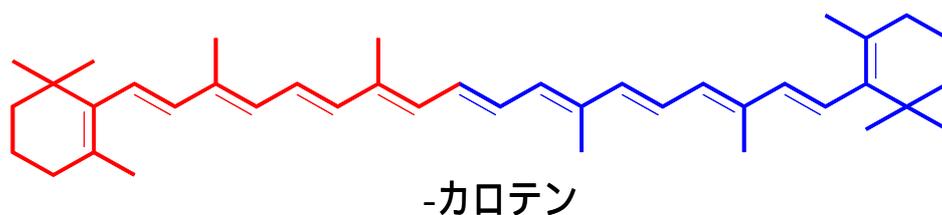


Fig.6 β -カロテンとビタミン A

6. オプシンシフト

レチナール単体が有機溶媒中に存在するときには吸収極大は約380nmのところにあるが、オプシンに覆われることで吸収極大は約500nmと大きく長波長シフトする。これをオプシンシフトという (Fig.6)。このシフトが起こるため、われわれ動物は太陽光線を通して感度よくものを見ることができる。

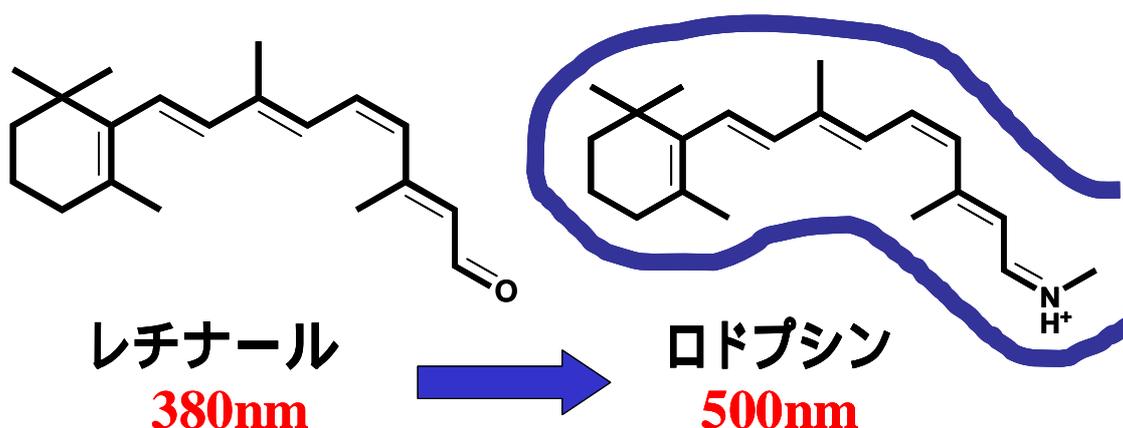


Fig.6 オプシンシフト

吸収波長の大きさというのは、基底状態と励起状態のエネルギー準位の差である。このエネルギー準位は主にレチナールのねじれ構造や電子状態で決まるのだが、電子状態は外部の電荷や結合状態など、環境により大きく影響を受ける。以下、ロドプシン環境で吸収波長を制御していると思われるいくつかの要素を挙げる。

- ・プロトン化シッフベースによる吸収波長への影響
- ・カウンターイオンによる吸収波長への影響
- ・その他の外部の負イオンによる吸収波長への影響
- ・共役鎖の長さによる吸収波長への影響
- ・共役鎖のねじれによる吸収波長への影響
- ・タンパク質部分の吸収波長への影響

これらの要素がそれぞれどの程度寄与しているのか、またこの波長シフトの分子機構はまだ完全には解明されていない。分子軌道計算はこの問題を解くに不可欠な手段である。

7. 光異性化反応

ロドプシンに光が吸収されるとレチナールは不安定なシス体から安定なトランス体になる。これを光異性化反応という。その結果、レチナールはオプシンと結合していることができず、オプシンとの結合は切断され、この結合の切断が信号になって脳に伝えられ、視覚が生じる。この光異性化はわずか 200fs という短時間で起こる。これは光が真空中をわずか 0.06mm だけ伝わる時間である。ロドプシン中のレチナールの光異性化反応の簡単な機構を Fig.7 に示す。

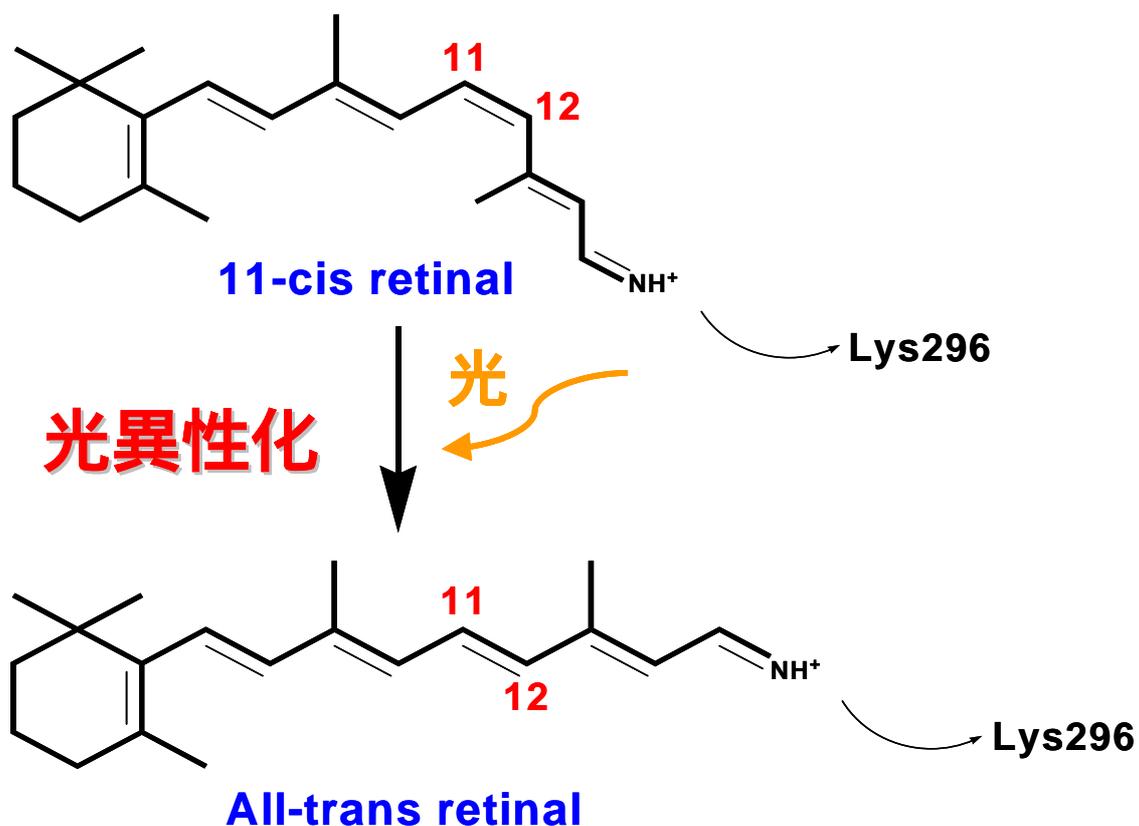


Fig.7 ロドプシン中のレチナールの光異性化反応

8. 計算方法

8.1 シングルポイントエネルギー計算

分子のエネルギー計算は、汎用量子化学計算プログラム”gaussian03”を使用した。基底状態のエネルギー計算は、RHF/6-31G(d)レベルで行い、励起状態の計算は RCIS/6-31+G(d)レベルで行った。

8.2 構造最適化

吸収波長を求めようとする全ての分子にたいして、半経験的分子軌道法計算プログラム”MOPAC2002”を用いて構造最適化計算を行い、分子の平衡構造を決定する。近似法として PM5 法を使用する。

ただし、X 線結晶構造解析で得られたロドプシンの構造の中から抜き出したレチナールとその周辺のアミノ酸については構造最適化は行わない。

8.3 吸収スペクトル計算

分子の吸収スペクトルは、半経験的分子軌道計算プログラム”MOS-F”をもちいて計算する。近似法として INDO/S 法を使用する。

9.実験結果および考察

9.1 レチナール単体の cis 体と trans 体のエネルギー

まず初めにレチナールの構造最適化を行い、cis 体と trans 体が単体で存在する時の最安定構造とその時のエネルギーを計算した。計算は RHF/6-31G(d)レベルで行った。

計算により求められた最安定構造を Fig.6 に、その時のエネルギーを Table4 にそれぞれ示す。

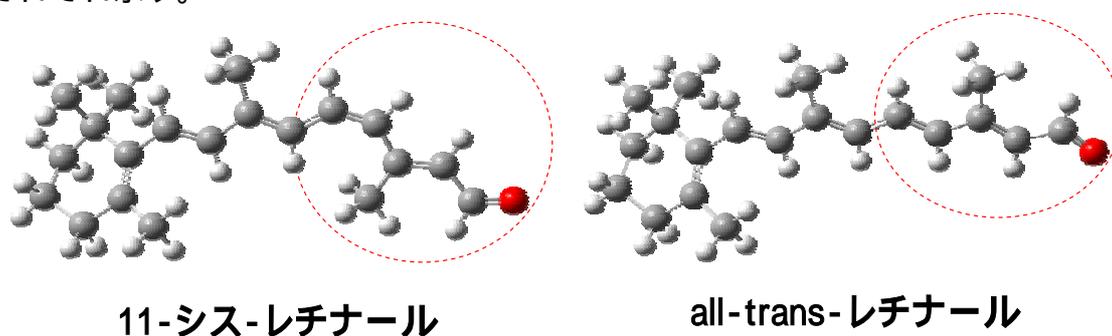


Fig.6 構造最適化したレチナールの構造

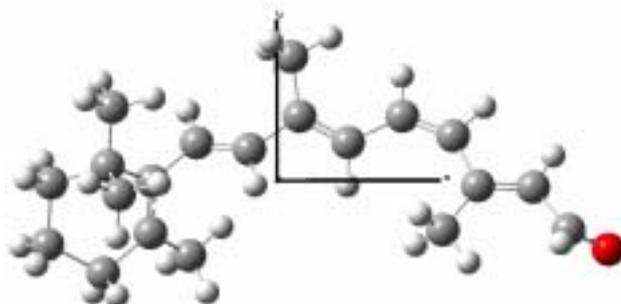
Table 4 レチナール単体のエネルギー

分子	Energy/hartree
11-cis-レチナール	-848.453
all-trans-レチナール	-848.463

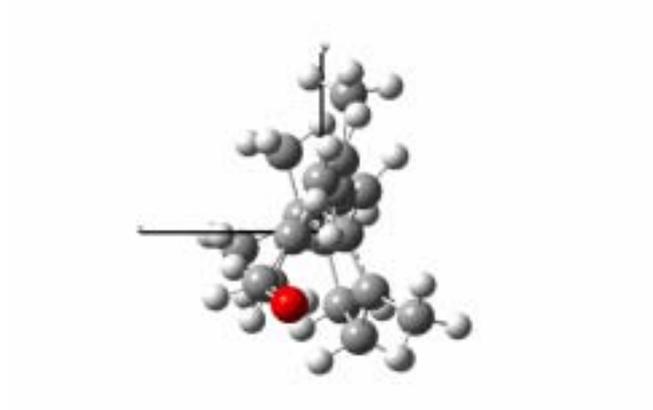
構造最適化の結果、レチナール分子の共役鎖部分は 11-cis 体と all-trans 体は共にほぼ平面であることがわかった。分子軌道法で求められた 11-cis-レチナールのエネルギーは-848.453hartree で、all-trans-レチナールのエネルギーは-848.463hartree となった。cis 体は trans 体よりも不安定であることがこの数字からわかる。この計算では cis 体が自由に動けるように分子構造を最適化したので、cis 体が単独で存在する場合の最もリラックスした構造についてのエネルギーを求めている。

しかしながら、視細胞中では cis 体はオプシン分子と結合しているため、その構造はかなり束縛されていることが予想される。したがって、実際には cis 体をとる構造はここで計算した構造よりずっと歪んでいて、より不安定な状態になっていることが予測される。よって、ここで言えることは、レチナール分子単体では cis 体は trans 体に比べて約 6.11kcal/mol 不安定であるということである。

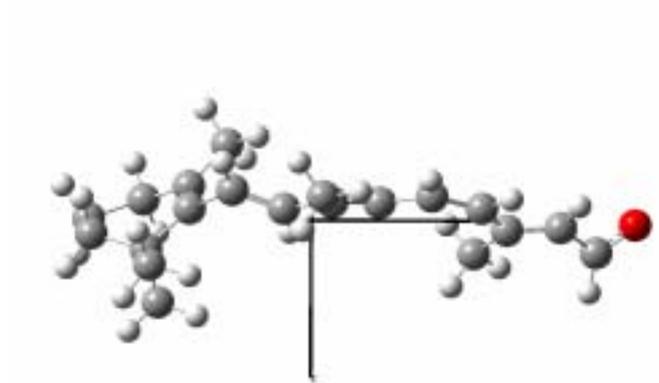
そこで X 線結晶構造解析により得られたロドプシンの構造からレチナール分子だけを取り出し、その構造においてシングルポイントエネルギー計算を行ったところ、そのエネルギーは-848.355hartree であった。これは cis 体が単独で存在する場合に比べて 61.5kcal/mol 不安定である。つまりレチナールはロドプシン中では単体で存在するときに比べて非常に不安定な状態であることがわかった。ロドプシン中のレチナール分子の構造は、Fig.7 に示すとおり平面から大きくねじれており、この構造の歪みがエネルギーの不安定化の原因の一つであると考えられる。



(a)



(b)



(c)

Fig.7 ロドプシン中のレチナール分子の構造

((a),(b),(c)はそれぞれ Z 軸、 X 軸、 Y 軸方向から見た図である)

9.2 ねじれ角に対するポテンシャルエネルギー面

レチナール分子が光を吸収して cis 体から trans 体に光異性化する際に回転する部分は C11=C12 である。一般的に二重結合のまわりの回転は不可能であると言われている。そこで分子軌道法を用いて、レチナール分子の C10-C11-C12-C13 のねじれ角を 0° (cis 体) から 180° (trans 体) まで少しずつ変化させて、分子のポテンシャルエネルギーがどのように変化するかを計算した。その結果を Fig.8 に示す。

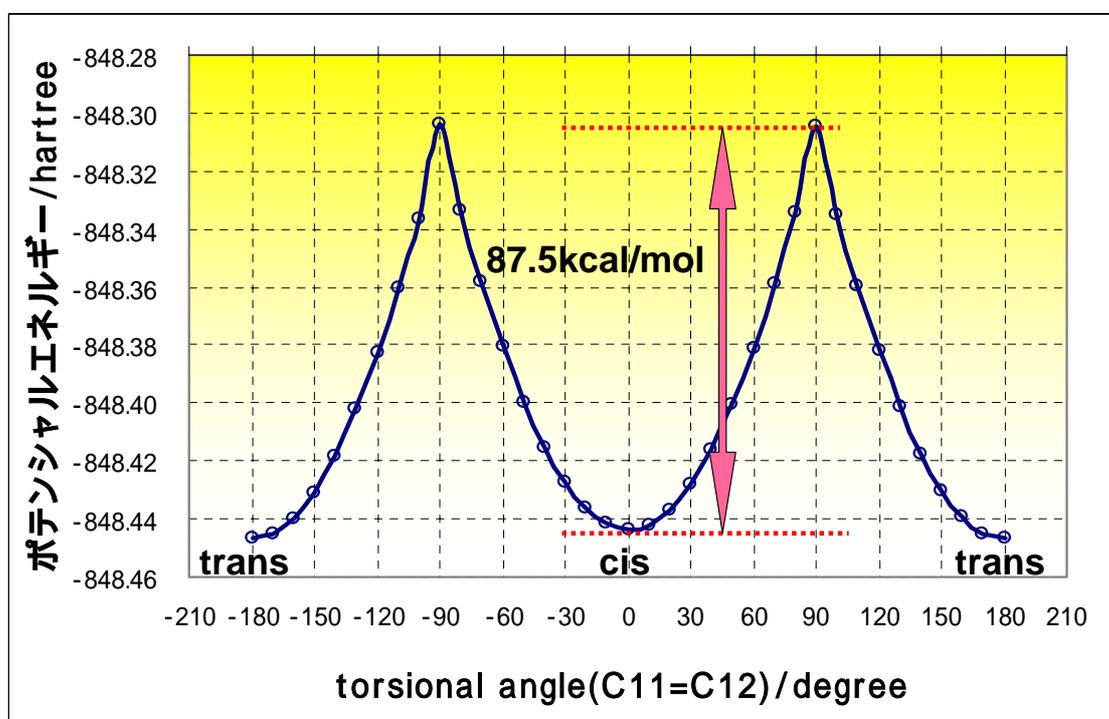


Fig.8 レチナール分子の C11=C12 のねじれ角に対するポテンシャルエネルギー面

Fig.8 はレチナール分子の基底状態のポテンシャルエネルギー面である。cis 体と trans 体の安定性はそれほど変わらないが、基底状態で cis 体から trans 体へと変化させる時のポテンシャル面の山はかなり高く (87.5kcal/mol) この山はいったん結合を切らないと越せない高さを持っていると考えられる。つまり熱反応で cis 体から trans 体をつくることは不可能と言える。

9.3 1,2-ジフルオロエチレンの光異性化

9.2 の結果から光異性化反応では基底状態だけでなく電子励起状態も関与していることは明らかである。一般に、炭素の二重結合 (C=C) 部分に光異性化を引き起こす性質がある。そこで、光異性化反応機構のメカニズムを調べるために、炭素の二重結合を一つだけ含む 1,2-ジフルオロエチレン (CHF=CHF) について考えることにする。Fig.9 に基底状態における 1,2-ジフルオロエチレンの cis 体と trans 体の構造を示す。また、分子軌道計算により求められた 1,2-ジフルオロエチレンの基底状態と励起状態のポテンシャルエネルギー面を Fig.10 に示す。



Fig.9 1,2-ジフルオロエチレンの cis 体と trans 体の構造

基底状態では、C=C の二重結合は結合性軌道であり cis 体、trans 体共に平面で安定化している。

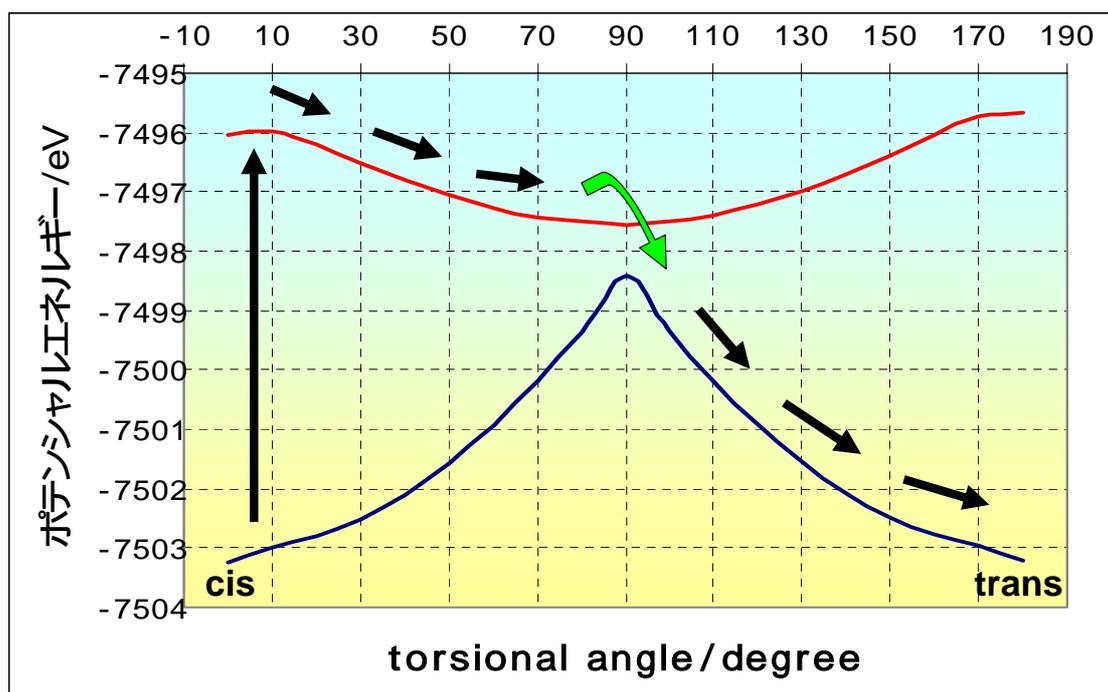


Fig.10 1,2-ジフルオロエチレンの基底状態と励起状態のポテンシャルエネルギー面

基底状態の cis 体が光を吸収し電子励起すると、電子状態が反結合性軌道に変化して、第一励起一重項 (S_1) 状態で不安定なポテンシャル面となる。この S_1 状態は電子が一個反結合性軌道に遷移した状態であるから、結合エネルギーが 0 となり、二重結合は結合のみとなっている。このため光反応条件下で回転可能となる。 S_1 状態では電子の位相が+と-となっており不安定なので、炭素炭素の結合部分をねじれさせて行き、ポテンシャルの極小点である 90° 付近で失活して基底状態に戻り、さらにねじれ角が回転して安定な結合性軌道をもった trans 体に変化する。これが電子状態およびポテンシャル面からみた 1,2-ジフルオロエチレンの光異性化メカニズムであり、レチナールにも同様なメカニズムが成り立つと考えられる。

9.4 レチナールの光異性化の際の構造変化モデル

実際にレチナール分子が光異性化する際にどのような構造変化が起きているのか？という問題に対して現在までにいくつかの構造変化モデルが提案されている。その中でも有力だと考えられるのが“ One-Bond Rotation model”と“ Twist Sharing model”である。以下に“ One-Bond Rotation model”と“ Twist Sharing model”について述べる。

< One-Bond Rotation model >

- 1 photon で 1 double bond の回転という考え方。
- ロドプシンの光異性化の際には C11=C12 の1つの2重結合だけ回転するメカニズム。

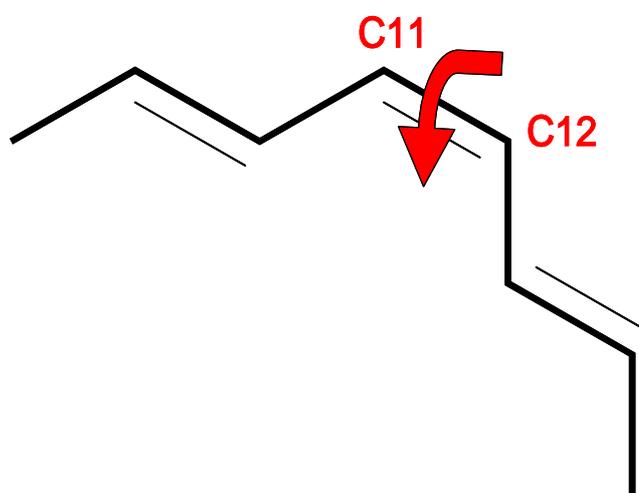


Fig.11 One-Bond Rotation model

< Twist Sharing model >

- ・一つの2重結合が回転する時に、同時に近くの多くの結合が逆方向に少しづつねじれることにより閉じ込められた空間での光異性化を可能にするメカニズム。

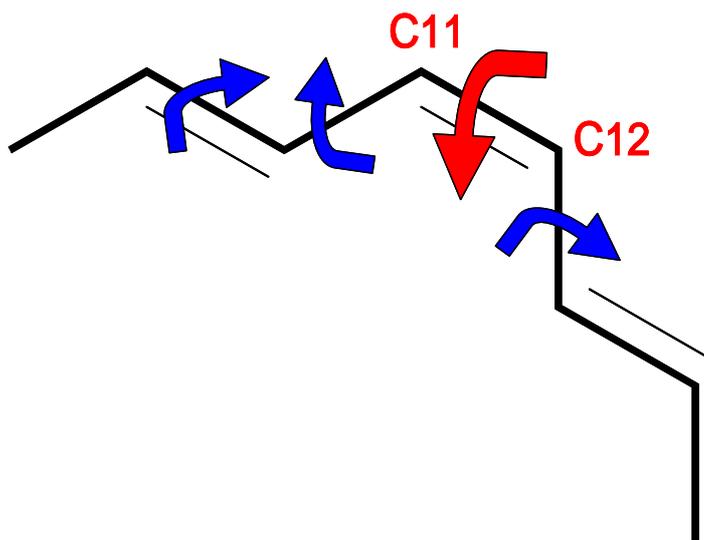


Fig.12 Twist Sharing model

この“Twist Sharing model”を提案した山田らの行った分子動力学シミュレーションによるとレチナールの光吸収前後のねじれ角は Table 5 のように求められている。

Table 5 レチナールの光吸収前後のねじれ角 (Twist Sharing Model)

ボンド	ねじれ角 (degree)	
	光吸収前	光吸収後
C6 - C7	-60	-72
C7=C8	-179	-172
C8 - C9	-157	175
C9=C10	176	-151
C10 - C11	152	178
C11=C12	-7	-142
C12 - C13	164	-132
C13=C14	176	-160
C14 - C15	-178	170

そこで Table 5 の光吸収前の構造から C11=C12 のねじれ角だけを 180° 回転させたとき (“One-Bond Rotation model”)と、C6 から C15 までの炭素 - 炭素結合を Table 5 の光吸収後の角度まで変化させたとき (“Twist Sharing model”)のそれぞれの基底状態と励起状態のポテンシャルエネルギー面を計算により求めた。結果を Fig.13 に示す。また 2 つのモデルにおける光異性化前後の構造を Fig.14 に示す。

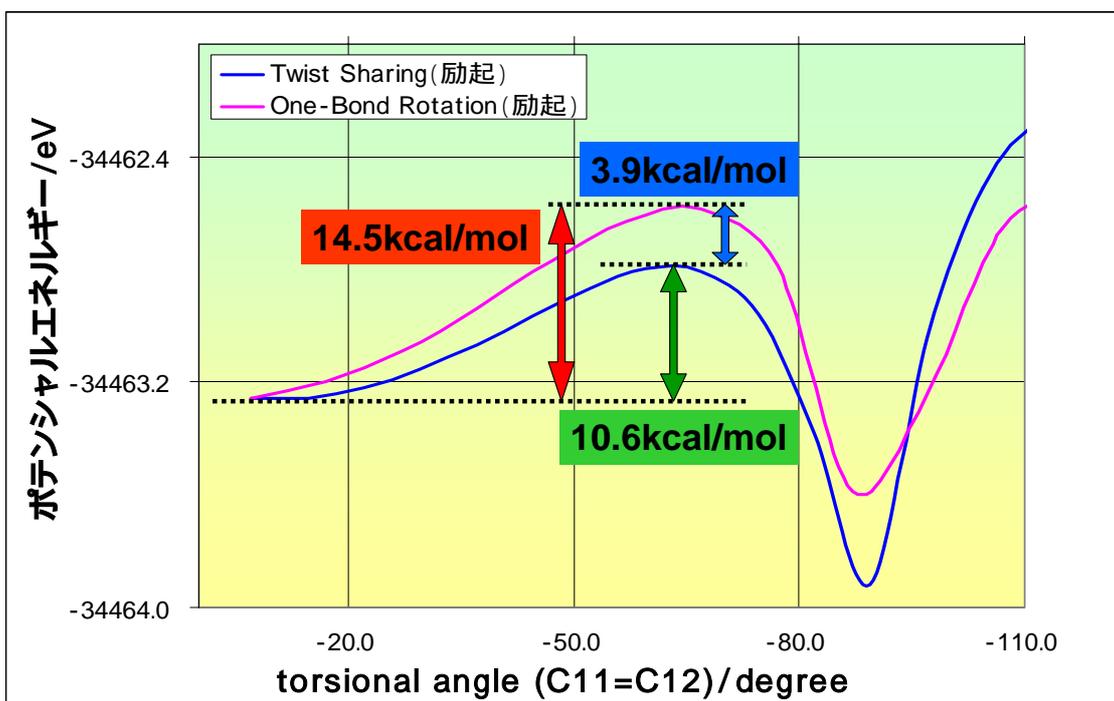
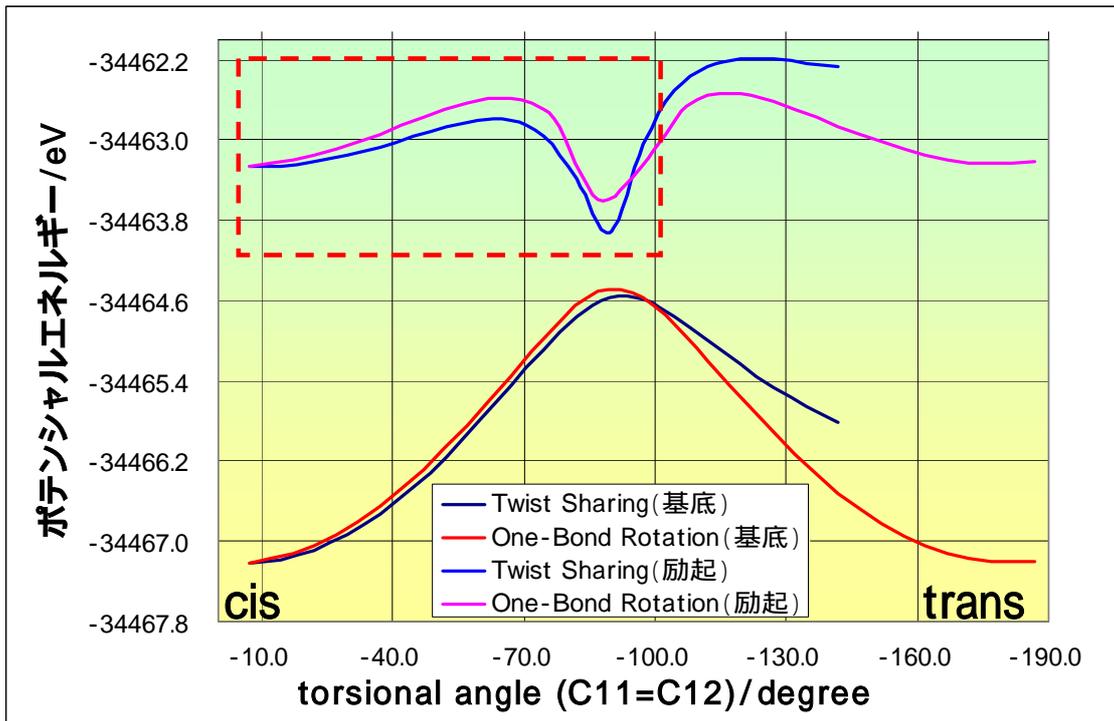
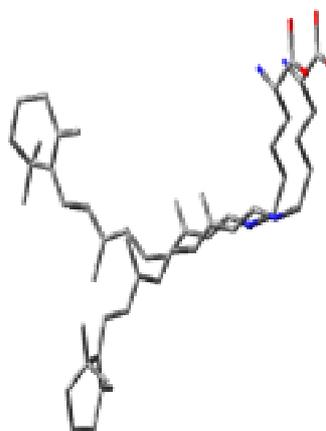


Fig.13 “One-Bond Rotation model”と“Twist Sharing model”のポテンシャルエネルギー面

このグラフから、レチナールの励起状態のポテンシャル曲面には cis 体からねじれた形の励起状態へと変化する過程で、活性化エネルギーの障壁が存在することがわかる。このことから電子励起した後にも光異性化を起こすための何らかの駆動力が働いていると思われる。この障壁は“Twist Sharing model”の方が“One-Bond Rotation model”に比べて約 3.9kcal/mol 小さい。

One-Bond Rotation Model



Twist Sharing Model

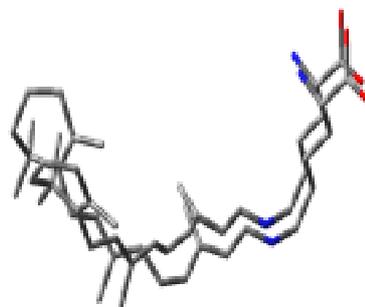


Fig.14 One-Bond Rotation model と Twist Sharing model の光異性化前後の構造

Fig.14 は各モデルの光異性化前後の構造を重ねたものである。図を見れば明らかのように、“One-Bond Rotation model”では光異性化前後で大きく構造が変化しているのに対して、“Twist Sharing model”は構造の変化がほとんどないことがわかる。

ロドプシン中のレチナル分子はタンパク質に覆われているため、非常に狭い空間で光異性化が起きている。つまり光異性化の際に大きな構造変化を起こすことは出来ないはずである。

したがって、ロドプシン中でのレチナルの光異性化反応では、励起状態の活性化エネルギーの障壁が小さく、異性化の際の構造変化の小さい“Twist Sharing model”が有力であると考えられる。

9.5 プロトン化シッフベースによる吸収波長への影響

レチナールはロドプシン中で 296 番目のリジン残基とシッフ塩基を結合している。そこでレチナールがリジン残基とシッフ塩基を結合したシッフベースレチナール (SBR) と、そのシッフ塩基がプロトン化したプロトン化シッフベースレチナール (PSBR) の吸収スペクトルを計算し、レチナールと比較することにより、プロトン化シッフベースによる吸収波長への影響を調べた。計算の結果を Fig.16 に示す。

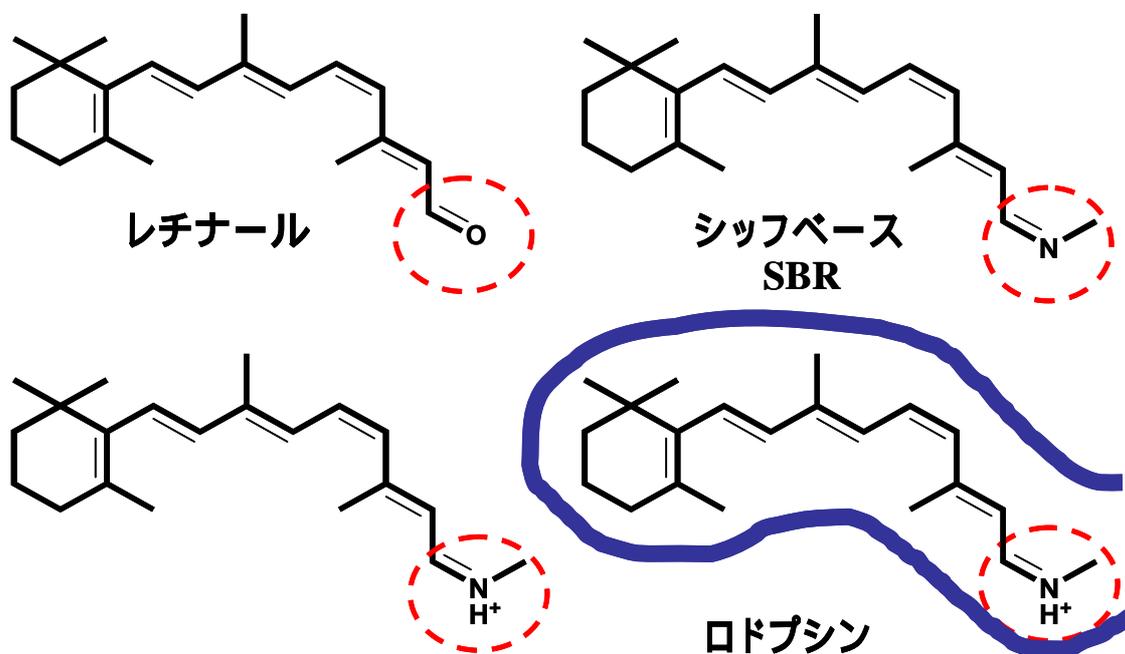


Fig.15 レチナール、SBR、PSBR の構造

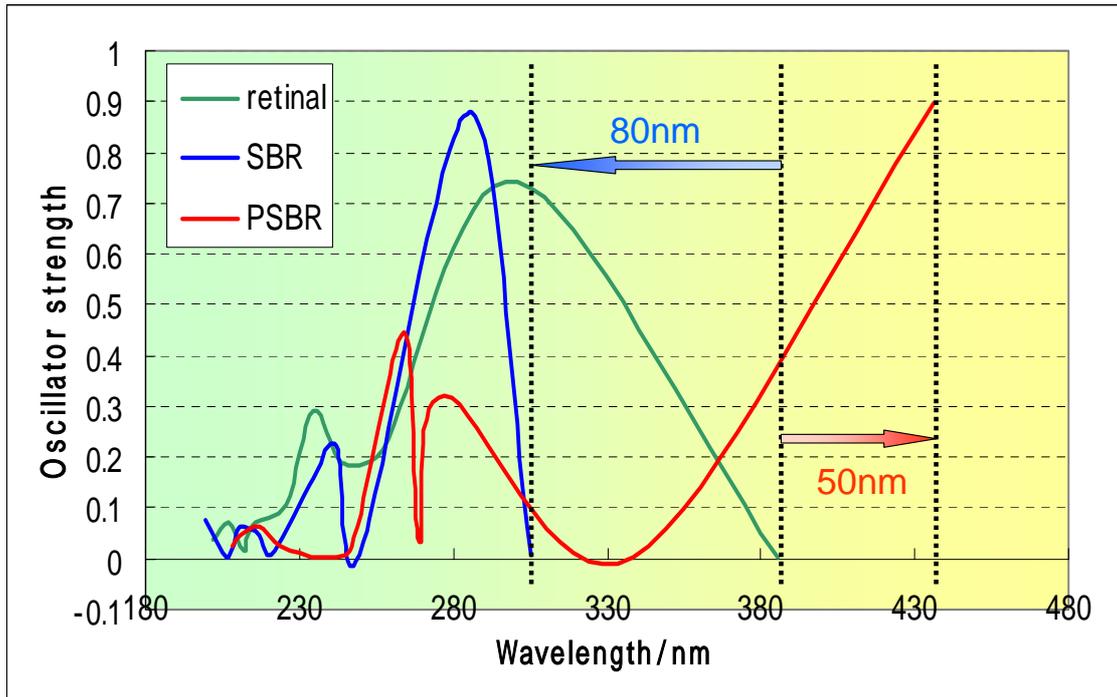


Fig.16 レチナル、SBR、PSBR の吸収スペクトル

レチナルがリジン残基とシッフ塩基結合を形成すると吸収波長は大きく短波長シフトするが、その結合がプロトン化することで吸収波長は大きく長波長していることがわかる。この結果からプロトン化シッフベースがオプシシフトと大きな要因であると結論付けられる。

9.6 共役鎖のねじれによる吸収波長への影響

レチナール分子の共役鎖は単体では平面であるが、ロドプシン中ではねじれた構造であることがわかっている。この共役鎖のねじれが吸収波長に与える影響を調べるために、Fig.17 に示したレチナール分子の C7-C15 までの各結合がねじれたときの吸収波長の変化を計算した。計算結果を Fig.18 に示す。

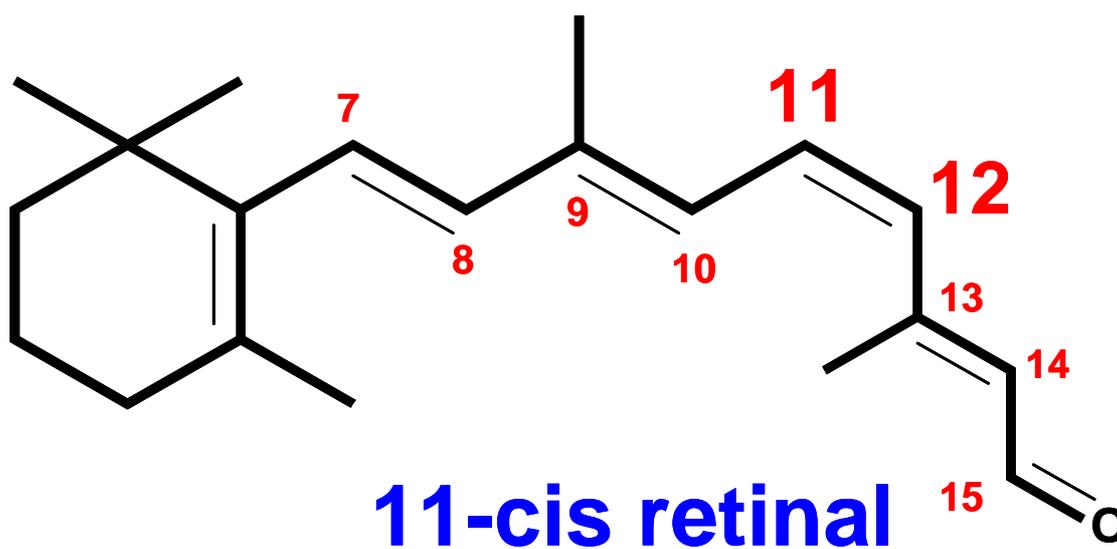


Fig.17 11-cis-レチナールの構造

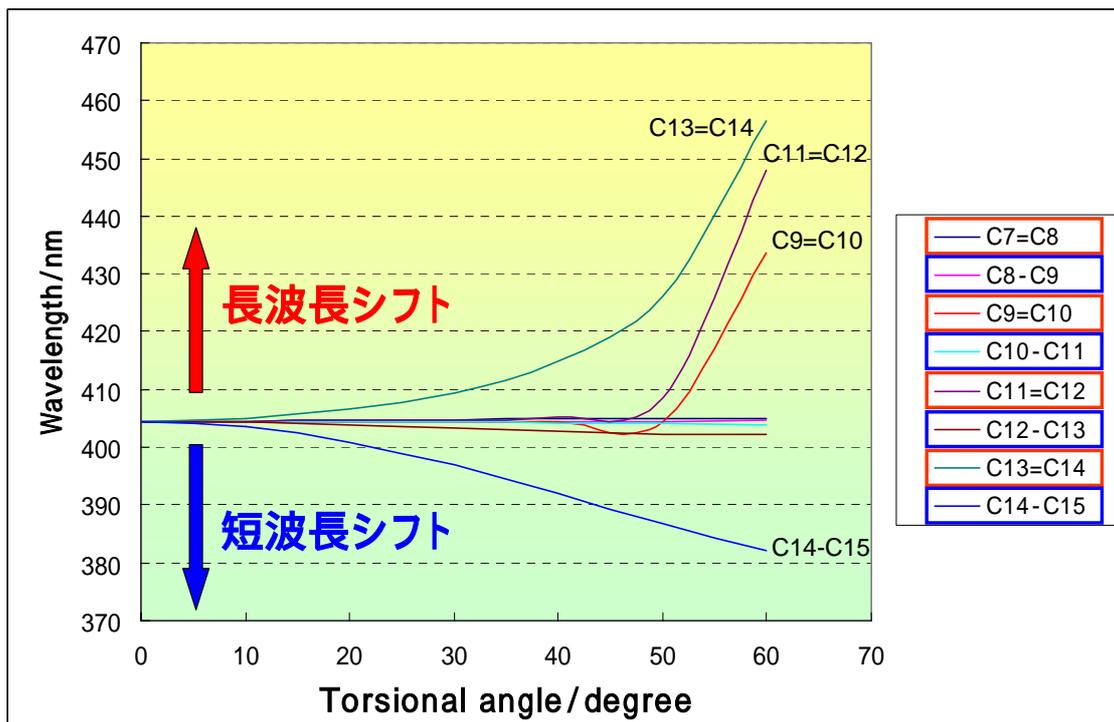


Fig.18 共役鎖のねじれによる吸収波長への影響

Fig.18 から、共役鎖の二重結合がねじれて平面からずれるほど長波長シフトすることがわかる。一方、共役鎖の単結合がねじれると短波長シフトする。このことから、ロドプシン中でレチナル分子の共役鎖が平面からねじれた構造をとるとき、長波長シフトする要素と短波長シフトする要素が競合していると考えられる。しかし、Fig.18 を見ると、ねじれることで C9=C10、C11=C12、C13=C14 の三つの二重結合が大きく長波長シフトしているのに対して、大きく短波長シフトする単結合は C14-C15 のみであることから、単結合が平面からねじれて短波長シフトする要素よりも、二重結合が平面からねじれて長波長シフトする要素の方が支配的であり、その結果オプシシフトが引き起こされると考えられる。

9.7 アミノ酸による吸収波長への影響

ロドプシン中ではレチナール周辺には多くのアミノ酸が存在している。そこでレチナール分子のプロトン化シッフベース周辺に存在する 8 個のアミノ酸残基と 1 個のカウンターイオン (Glu113) の影響を調べる。計算に用いたレチナールとその周辺の構造を Fig.19 に示す。また各アミノ酸の配置を Fig.20-Fig.29 に示す。

レチナールとその周辺のアミノ酸の構造は X 線結晶構造解析から得られたロドプシンの座標から抜き出した。

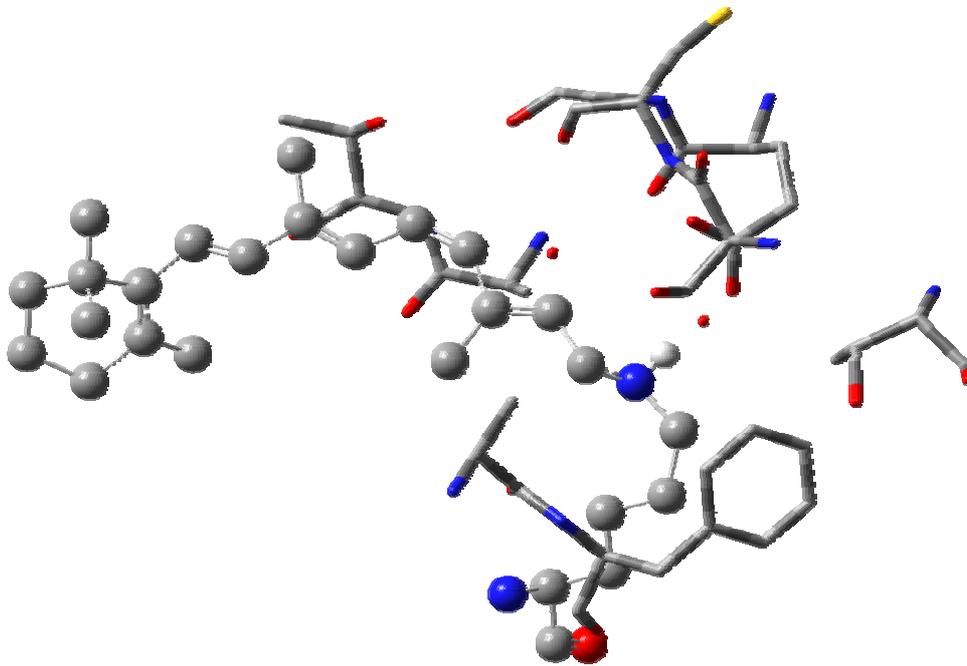


Fig.19 PSBR と周辺の9つのアミノ酸残基の構造

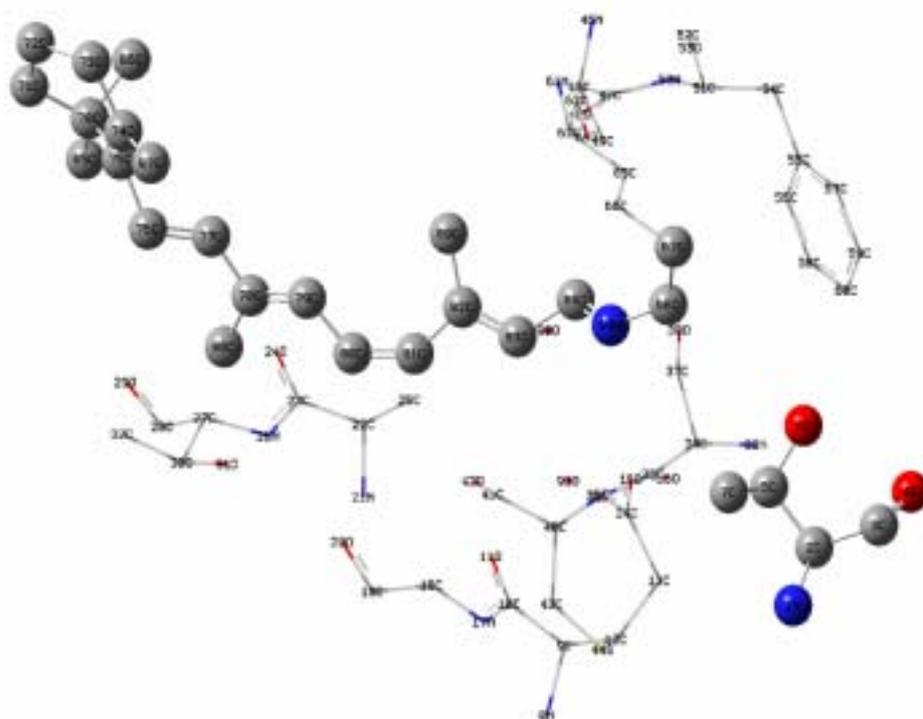


Fig.20 THR94

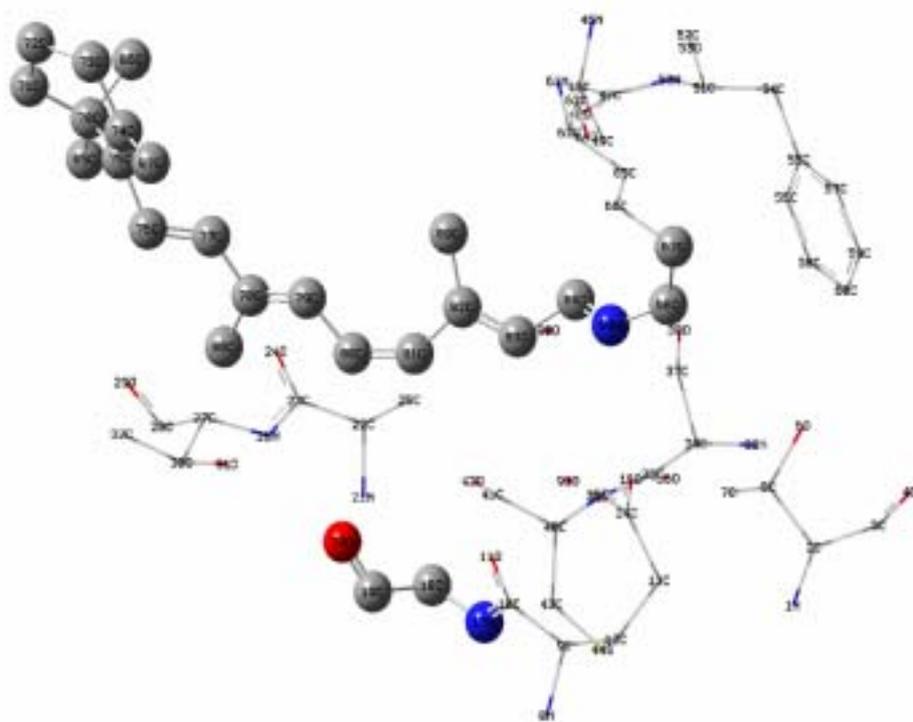


Fig.22 Gly114

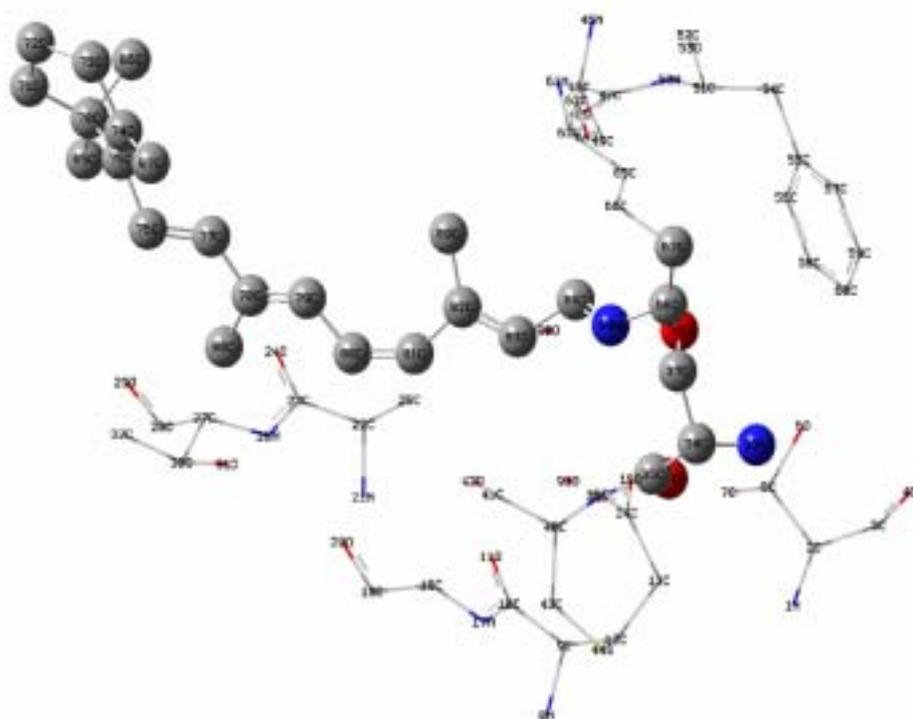


Fig.25 Ser186

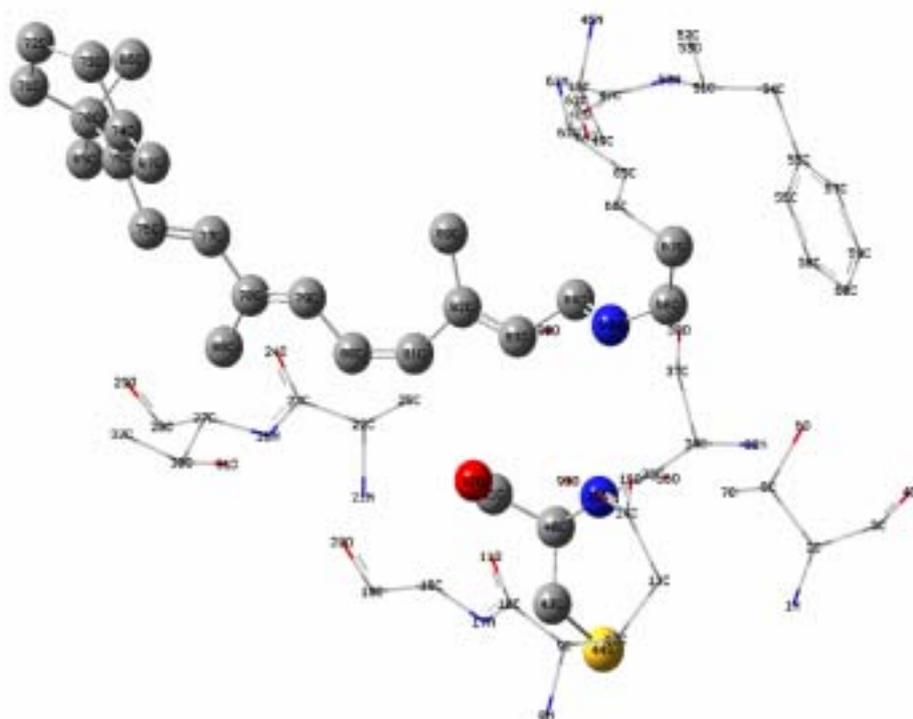


Fig.26 Cys187

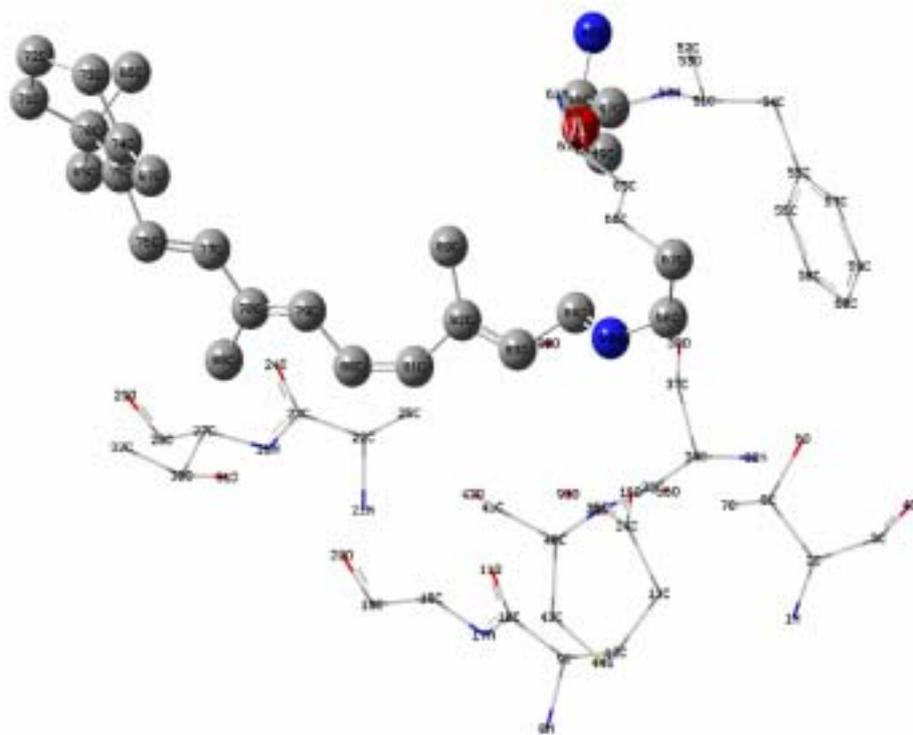


Fig.27 Ala292

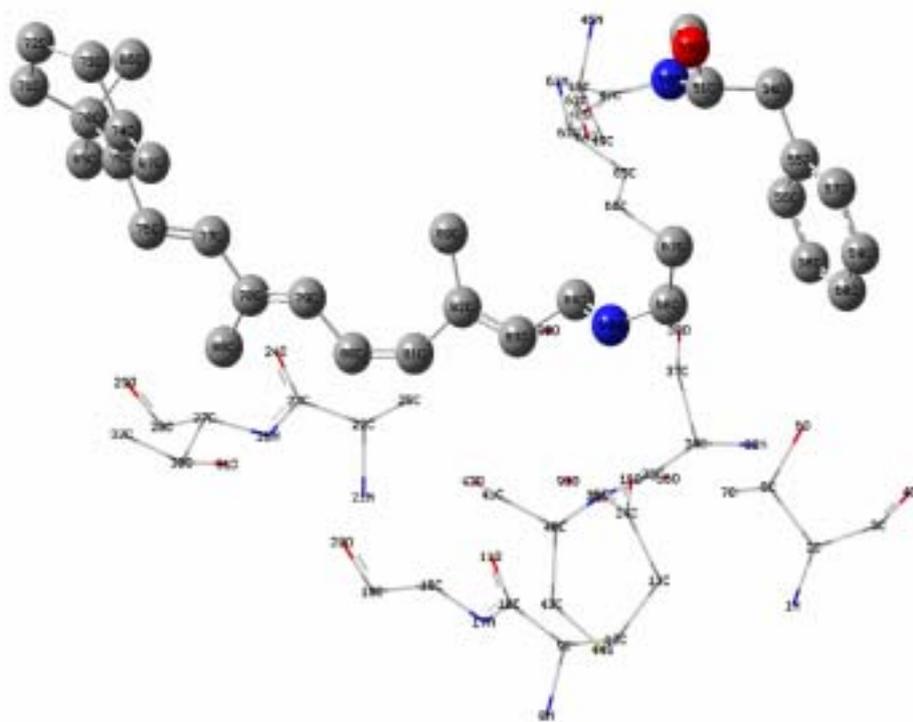


Fig.28 Phe293

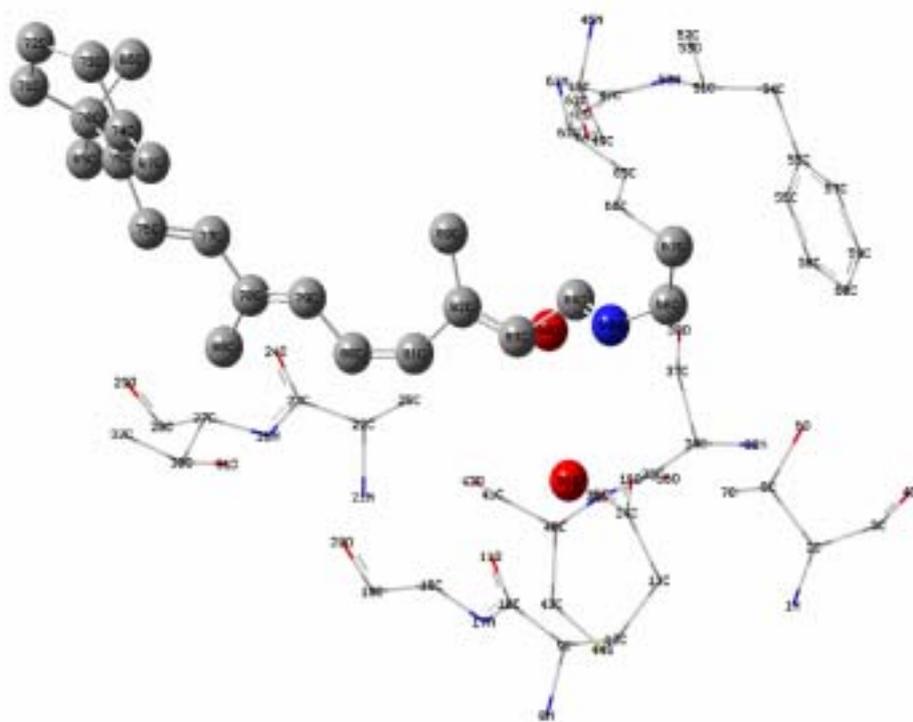


Fig.29 H2O

まず、レチナールと各アミノ酸一つの相互作用エネルギーを計算した。計算結果を Table 6 に示す。また結果をグラフ化したものを Fig.30 に示す。

Table 6 PSBR とアミノ酸の相互作用エネルギー

Model	分子量	E/eV
2water	36	0.239
Gly114	75	0.004
Ala117	89	0.109
Ala292	89	-0.261
Ser186	105	-0.024
Thr94	119	-0.196
Thr118	119	-0.024
Cys187	121	-0.229
Glu113(counterion)	146	-4.075
counterion(far distance)	146	-0.449
Glu113	147	-0.155
Phe293	165	0.003
9aminoacid	1028	-3.956
9aminoacid+2water	1064	-3.706

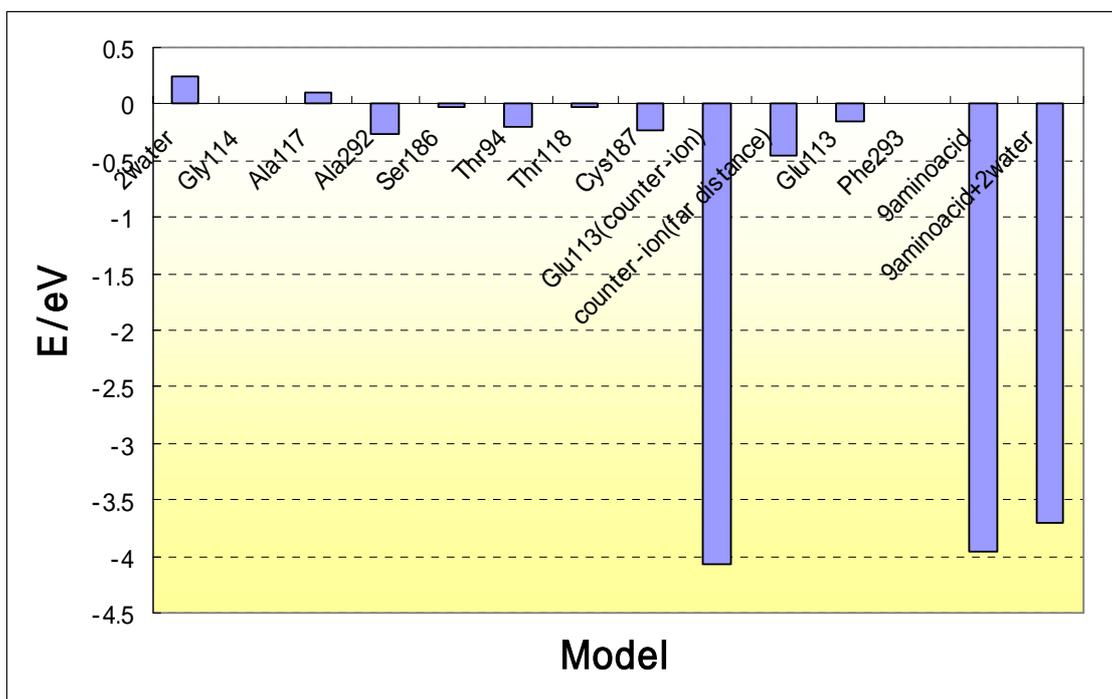


Fig.30 PSBR とアミノ酸の相互作用エネルギー

相互作用エネルギー (E) が正ならば不安定化させる働きを、逆に負ならば安定化させる働きをしている。表中の 9aminoacid は 9 つのアミノ酸すべてを含めて計算した結果である。レチナールはオプシンに覆われることで安定化していることがわかる。特に PSBR の正電荷のカウンターイオンである Glu113 は安定化に大きな影響を与えている。

次にレチナール周辺に各アミノ酸一つが存在する時の吸収スペクトルを計算した。結果を Fig.31 に示す。

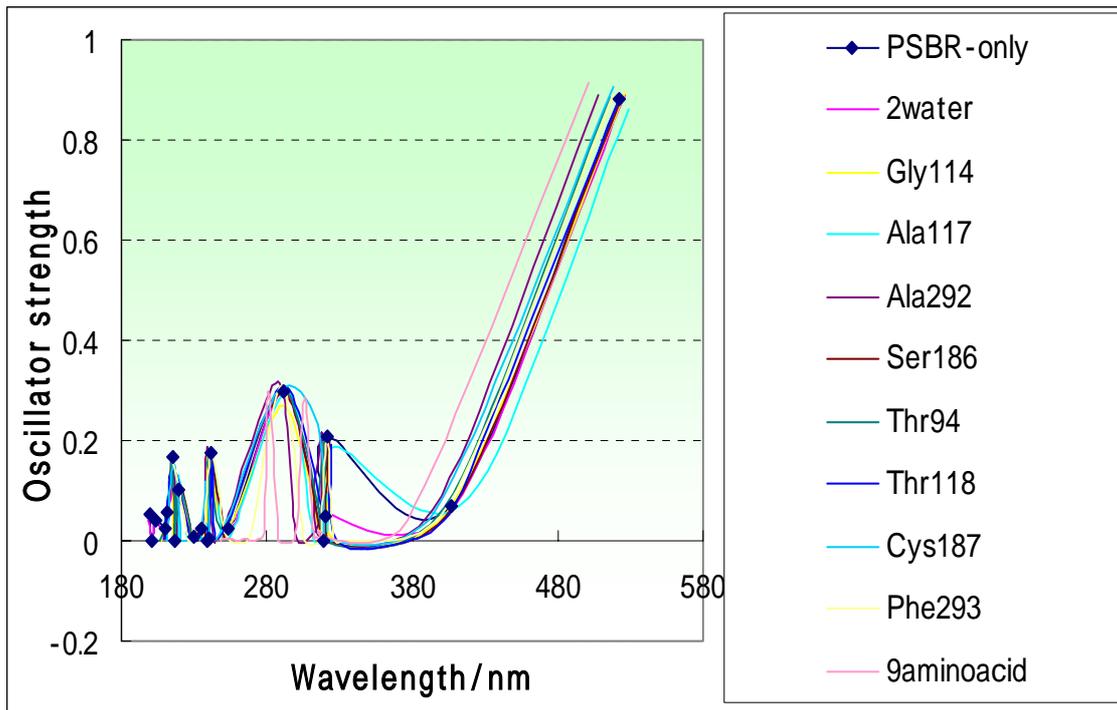


Fig.31 アミノ酸の吸収波長への影響

アミノ酸の吸収波長への目立った影響は見られないことがわかる。このグラフの 490nm-530nm 付近を拡大したものを Fig.32 に示す。

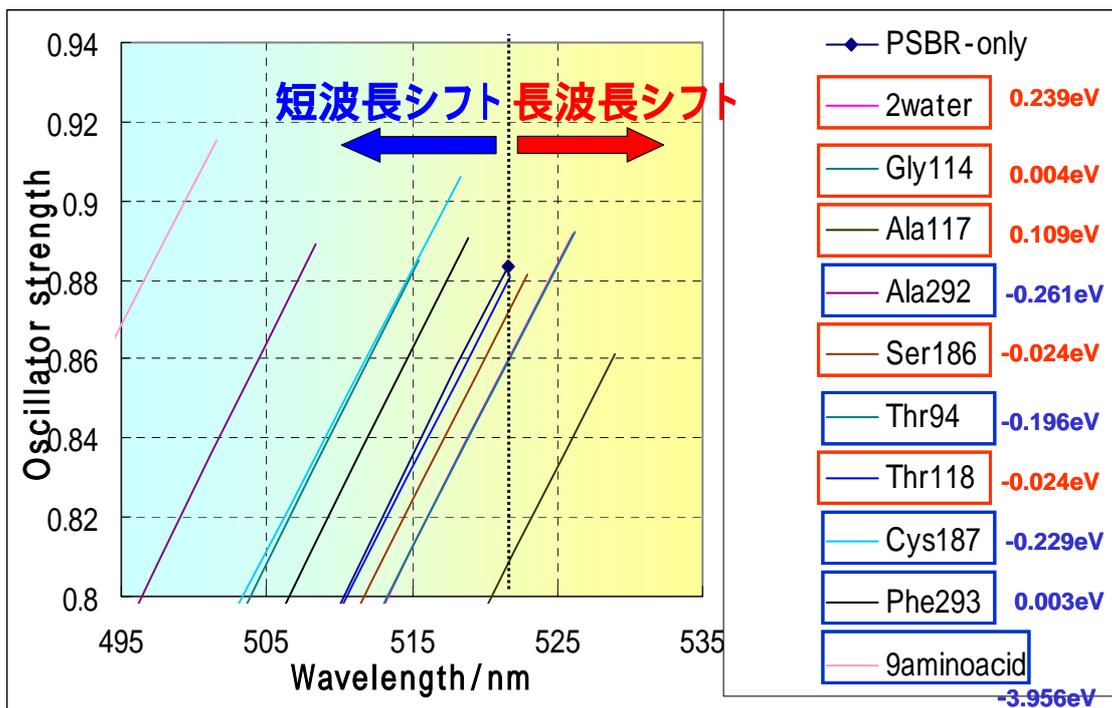


Fig.32 アミノ酸の吸収波長への影響

このグラフを見ると、基本的には相互作用エネルギーが正、つまり不安定化させる働きをしているアミノ酸では長波長シフトし、逆に相互作用エネルギーが負、つまり安定化させる働きをしているアミノ酸では短波長シフトするようであるがその影響は比較的小さいものであると思われる。

9.8 カウンターイオンの吸収波長への影響

最後にカウンターイオンが吸収波長に与える影響を計算した。計算方法はアミノ酸の場合と同じである。計算結果を Fig.33 に示す。

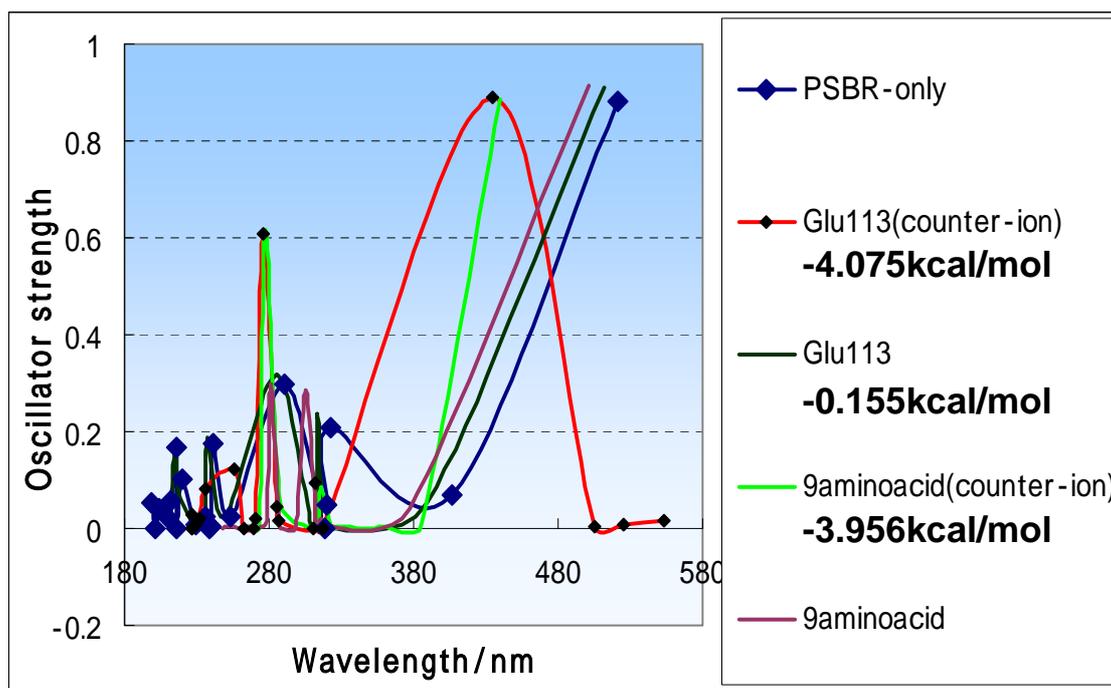


Fig.33 カウンターイオンの吸収波長への影響

Fig.33 より、プロトン化シッフベースの近くにカウンターイオンが存在すると吸収波長は大きく短波長シフトすることがわかる。また、このカウンターイオンは光異性化の進行にともない Glu113 から Glu181 へスイッチし、その際にロドプシンの吸収波長は長波長シフトすることが報告されている。つまり、光異性化の途中で Glu113 はカウンターイオンでなくなるのである。そこで、Glu113 が負に帯電していないときの吸収波長を計算したところ、カウンターイオンの時と比較して大きく長波長シフトした。これらの結果から、プロトン化シッフベース周辺のカウンターイオンはオプシシフトに対して大きな影響を与えていることがわかった。

10. 結論

ロドプシンのモデル分子としてレチナール周辺の9つのアミノ酸を含めた構造での吸収波長の計算結果は約440nmであり、実測値(500nm)を再現することはできなかった。実際のロドプシンの分子量は約40000であるのに対して、今回の計算で用いたモデル分子の分子量は約1300であり、タンパク質部分をほとんど考慮していない。このことからタンパク質部分がオプシシフトに対して大きく寄与していると考えられる。しかし、ロドプシン中におけるレチナールの安定性やオプシシフトに影響を及ぼしているいくつかの要因を定性的に分析することは出来たと思われる。

11. 参考文献

- [1] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* 289(2000) 739.
- [2] Atsushi Yamada, Takahisa Yamato, Toshiaki Kakitani, Shigeyoshi Yamamoto (*J. Photoscience* vol.9(2) (2002) 51-54.)
- [3] 菊池修、“基礎量子化学”、朝倉書店(1997)
- [4] 平野恒夫、田辺和俊、“分子軌道法 MOPAC ガイドブック”、海文堂(1996)
- [5] 櫻井実、猪飼篤、“計算機化学入門”、丸善(1999)
- [6] 堀憲次、山崎鈴子、“計算化学実験”、丸善(1998)
- [7] 時田澄男、“カラーケミストリー”、丸善(1982)
- [8] 広田穰、“紫外・可視スペクトルの解釈”、共立出版(1965)
- [9] 堀江一之、牛木秀治、渡辺敏行、“光機能分子の科学”、講談社(2004)

12. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究全般について御指導を頂きました片岡洋右教授に心より御礼申し上げます。また、一年間お世話になった片岡研究室の大学院生、学部生をはじめとして、本研究に協力して頂いた全ての方に感謝申し上げます。ありがとうございました。