

2017A 期 採択長期利用課題の紹介

公益財団法人高輝度光科学研究センター
利用推進部

2017A 期は 7 件の長期利用課題の応募があり、4 件が採択されました。採択された課題の審査結果および実験責任者による研究概要を以下に示します。

－ 採択課題 1 －

課題名	低コストフレキシブル太陽電池の実現に向けた有機無機ハイブリッド材料の構造および電子状態解析
実験責任者名 (所属)	宮寺 哲彦 (産業技術総合研究所)
採択時の課題番号	2017A0136
ビームライン	BL46XU
審査結果	採択する

[審査コメント]

有機系の新材料や低温プロセスで作成可能なペロブスカイト太陽電池など、現在普及しているシリコン系太陽電池よりも低コストで高効率な太陽電池開発を目指した研究課題であり、これを実現することができれば社会的意義は高い。申請者らはフレキシブルデバイスの実用化を目指した要素技術を研究開発するため、有機薄膜・有機鉛ペロブスカイト薄膜の結晶構造および電子状態の解析を行うことを提案している。具体的には、(1) 薄膜形成過程の斜入射広角 X 線回折 (GI-WAXS) の実時間観察、(2) 真空製膜した薄膜の構造解析や界面電子状態解析、(3) コンビナトリアル成膜手法を用いた試料の構造・電子状態解析、(4) 有機トランジスタの operando 光電子分光解析が提案されている。しかしながら、放射光を用いた解析結果をより性能の高い材料開発にどの様にフィードバックしていくのか、太陽電池と有機トランジスタがどの様に結びつくのか、課題有効期間の間の具体的な達成目標やそのためのマイルストーンなどや、4つの主要な研究課題を個別課題ではなく、長期利用課題として一体的に実施することによって生み出させる相乗効果が鮮明でなく、相当部分は個別課題でも実施可能と判断される。

一方、有機薄膜形成過程の観察およびモバイルコン

ビチャンバーを SPring-8 の設備と組み合わせて使える様にすることは、手法開発と平行して研究成果を上げていく上でも長期利用課題が適当であり、手法が実用化することで新しい展開を期待出来るので、是非進めて成果を出して頂きたい。コンビナトリアル解析を行うにあたっては、予め物性を押さえた上で必要な測定を行うなど、限られたビームタイムを有効に活かし、高性能の太陽電池を実現することを期待する。

[実験責任者による研究概要]

有機系の新材料を用いた太陽電池によりシリコン太陽電池ではなしえなかった低コスト化を実現することが期待されている。特に 2013 年以降急速に発展し、短期間で 20%を超える高い光電変換効率が達成されたペロブスカイト太陽電池は、低コストかつ高効率な次世代太陽電池として注目されている。ペロブスカイト太陽電池は低温プロセスが可能であることから、高効率なフレキシブル太陽電池の実現も可能となる。また、他の有機材料の代表として有機薄膜太陽電池に関してはフレキシブルやシースルー太陽電池のような形で製品の試作がすでに行われており、実用化に向けた動きが活発となってきている。

本研究課題においてはフレキシブルデバイスの実用化を目指した要素技術の研究開発のため、放射光を利用して、有機薄膜・有機鉛ペロブスカイト薄膜の結晶構造および電子状態の解析を行う。フレキシブルデバイスとして、有機薄膜太陽電池、有機鉛ペロブスカイト太陽電池、さらにはそれらを制御する有機トランジスタを対象とした研究を行う。具体的な実験項目としては、1. 有機薄膜太陽電池や有機鉛ペロブスカイト太陽電池の薄膜形成過程の斜入射広角 X 線回折 (GIWAXS) リアルタイム観察、2. 真空製膜により

精密に制御された有機薄膜、有機鉛ペロブスカイト薄膜の構造解析、3. 同一基板上に組成や製膜温度などの製膜条件を連続的に変化させるコンビナトリアル製膜手法によるサンプルの構造解析、となっている。

研究体制として、産業技術総合研究所、諏訪東京理科大学、東北大学、株式会社コメットと協力して研究を推進する。それぞれが個別のテーマに取り組むという事ではなく、それぞれの技術を持ち寄って一体となって研究を進めていくことで、ハイスループットな物性探索、機能評価を行っていく。SPring-8 の長期利用課題を軸とした産学連携体制を構築し、現在注目を集めているフレキシブルデバイス、特に有機鉛ペロブスカイト太陽電池の研究を推進していく。

－ 採択課題 2 －

課題名	NRVS of mononuclear and binuclear non-heme iron enzyme intermediates and related model complexes
実験責任者名 (所属)	Edward Solomon (Stanford University)
採択時の課題番号	2017A0137
ビームライン	BL09XU
審査結果	採択する

[審査コメント]

This proposal is a renewal of the Long-Term project performed in 2013B through 2016A. The goals of the project are to understand the factors that govern differences in reactivity of mononuclear vs. binuclear non-heme iron enzyme intermediates, to understand the key differences in reactivity for non heme vs. heme iron enzymes, and to determine why different modes of oxygen activation are utilized for specific functions. The research theme set in the project is important in enzyme research. For these goals, a combination of nuclear resonance vibrational spectroscopy (NRVS) experiment and density functional theory (DFT) computation is used, which has been developed by the previous Long-Term project and earlier experiments. This methodology is expected to provide a complete picture of the reaction mechanism on a molecular level.

The renewal proposal includes the extension of the previous studies, such as non-heme facial triad and heme Fe(IV)=O intermediates, Fe(III)-OO(H) intermediate in Rieske dioxygenases, O₂ intermediates in extradiol dioxygenation,

peroxy intermediates and high valent intermediates. These studies are appropriate for achieving the goals and lead to publications in major journals. The experiments proposed are challenging because of low concentration intermediates and thus the project indeed needs the high brilliance x-rays at BL09XU, SPring-8. On the other hand, a new high-resolution monochromator for NRVS will be installed in the BL09XU beamline, which improve the data-taking efficiency. Therefore, the committee recommends that the renewal proposal should be approved with a reduced number of beamtime shifts.

[実験責任者による研究概要]

Mononuclear and binuclear non-heme iron (NHFe and NH₂Fe, respectively) enzymes exhibit a wide range of chemistry and play important roles in biosynthesis, DNA repair, and the treatment of diseases. The purpose of our research is to use nuclear resonance vibrational spectroscopy (NRVS) to characterize catalytically relevant intermediates of non-heme enzymes and to understand mechanisms governing their unique chemistry. NRVS provides key vibrational information on the NHFe active sites. This vibrational density of states gives geometric and electronic structural insight into the intermediates and their frontier molecular orbitals that are key to reactivity.

Intermediates in NHFe enzymes can be broadly divided into three classes: Fe^{IV}-oxo, Fe^{III}-(hydro)peroxo, and Fe^{III}-superoxo. In the area of Fe^{IV}-oxo intermediates, we have recently made great progress in defining the structure of the Fe^{IV}-oxo intermediate in the halogenase SyrB2 through NRVS and using this structure to define the frontier molecular orbital contributions that govern hydroxylation versus halogenation reactivity in this class of enzymes. We are now expanding these studies to the Fe^{IV}-oxo intermediate in the alpha-ketoglutarate dependent enzyme taurine dioxygenase to form a basis for understanding the hydroxylation, desaturation, and electrophilic aromatic substitution reactions catalyzed by this class of enzymes.

In the area of Fe^{III}-(hydro)peroxy intermediates, we have previously used NRVS to define the structure of the active intermediate in the low spin Fe^{III}-OOH intermediate in the anticancer drug bleomycin and used this to understand the differences between heme and non-heme Fe^{III}-OOH

reactivity. Recently, we extended these studies to a series of high-spin Fe^{III} peroxy model complexes to define the effect protonation state and peroxy binding mode have on the NRVS spectrum, allowing us to define spectral features that distinguish between side-on peroxy, side-on hydroperoxy, and end-on hydroperoxyl structures. We are now in the process of extending these studies to the peroxy intermediate in the Rieske dioxygenase benzoate 1,2-dioxygenase to define its structure and correlate this to its reactivity, which we will complete under this long-term proposal.

The extradiol dioxygenases are a class of NHFe enzymes proposed to proceed through a Fe^{III}-superoxy intermediate. Previously, we have collected and analyzed NRVS data on two relatively stable intermediates in an extradiol dioxygenase, including a putative Fe^{III}-superoxo intermediate and a Fe^{III}-hydroperoxo intermediate, that are not reactive in extradiol cleavage, in addition to nitrosyl analogues where NO mimics O₂ binding. This has allowed us to define the structural factors that influence the NRVS spectra of these intermediates. In the current long-term proposal, we are now extending those studies to a series of extradiol dioxygenase intermediates active in extradiol cleavage to define the structures of these intermediates and correlate these to their reactivity in building the reaction coordinate for extradiol deoxygenation. We will also initiate NRVS studies on two intermediates in the intradiol dioxygenase protocatechuate 3,4-dioxygenase, which will define the reaction coordinate of this class of enzymes and, together with the extradiol study, give insight into the factors that govern extradiol versus intradiol cleavage.

NH₂Fe enzyme reactivity can be divided into two major classes of intermediates: peroxy and high-valent intermediates. For the peroxy intermediates two subclasses are further distinguished: P and P', which exhibit different UVvis absorption bands and Mössbauer parameters (~700 nm, $\delta \approx 0.66$ mm/s and $\Delta E_q \approx 1.5$ mm/s for P versus no visible UVvis band, $\delta \approx 0.55$ mm/s and $\Delta E_q \approx 0.66$ mm/s for P') and only P' is reactive. With respect to high-valent intermediates, there is the Fe(IV)/Fe(IV) intermediate Q in methane monooxygenase (MMO) and the Fe^{IV}/Fe^{III} intermediate X in ribonucleotide reductase (RNR). In previous studies, we focused on intermediates P and Q and

we will now extend these studies to understand the P' and X intermediates.

Recently, we showed that P' in AurF, which performs an electrophilic attack, is a hydroperoxy species. We are now extending this to the N-oxygenase CmlI, which is believed to contain a $\mu\text{-}\eta^1 : \eta^2$ peroxy, rather than a hydroperoxy as in AurF and CmlI. We are currently investigating isotope labeled ¹⁶18O₂ P' intermediates of CmlI. We will extend this study to toluene o-xylene monooxygenase (ToMO), which performs an electrophilic attack on aromatic rings and utilizes 2His/4Glu ligation instead of the 3His/4Glu ligation of AurF. We will elucidate how the different ligation facilitates similar reactivity. In contrast to AurF, CmlI and ToMO, aldehyde-deformylating oxygenase (ADO) performs nucleophilic rather than electrophilic reactivity. We will elucidate geometric and electronic differences that lead to these different reactions. Furthermore, the P intermediate in deoxyhypusine hydroxylase (exhibiting a down-shifted UVvis band at ~630 nm) is believed to contain an additional $\mu\text{-O(H)}$ bridge and a 4His/2Glu ligation set. We will use NRVS to define how this peroxy species relates to those summarized above.

We recently finished our NRVS study of Q in MMO and are using these data to define how the binuclear core is more reactive relative to the mononuclear Fe=O species in SyrB2 in H-atom abstraction. We will extend these studies to intermediate X in RNR class 1a and compare our findings to results from our previous NRVS study which defined a Mn/Fe class 1c RNR, which exhibits Q- and X-analog (Mn^{IV}/Fe^{IV} and Mn^{IV}/Fe^{III}, respectively) intermediates. This study of X focuses on its function of generating the tyrosyl radical required for deoxyribonucleotide synthesis in class 1a versus the Mn^{IV}/Fe^{III} providing the radical directly class 1c RNR.

— 採択課題 3 —

課題名	電気化学反応速度と HAXPES の複合同時計測を目指した新規 operando フローセルシステムの開発と燃料電池触媒への応用
実験責任者名 (所属)	犬飼 潤治 (山梨大学)
採択時の課題番号	2017A0138
ビームライン	BL46XU
審査結果	採択する

[審査コメント]

本課題は電気化学反応測定と同時に HAXPES 測定を行う技術を開発し、反応中の燃料電池触媒の化学状態を明らかにすることを目的としている。SPring-8 の複数の専用ビームラインにおいては、燃料電池反応の解析を目的に差動排気型光電子分光装置の導入による準大気圧下での HAXPES 測定技術の開発が行われているが、現状では共用ビームラインでは実施することが難しい。本課題は装置開発終了後に一般ユーザーによる利用も視野に入れている上、この技術は燃料電池触媒のみならず、二次電池、腐食、鍍金等の広い分野での利用が期待されるため、長期利用課題に相応しい申請である。また、装置開発は NEDO プロジェクトの一環として行われるため、資金面での懸念はない。

フローセル窓材の圧力耐性評価を行うなど、本格的な技術開発に向けた準備に着手していることは評価できるが、現段階では一部の技術的課題の克服方法が確立していない。特に、フローセル窓材の破壊は HAXPES 装置に致命的な障害を与えかねないので、窓材の圧力耐性のみならず X 線照射劣化に関する十分な試験検討が必須である。課題申請では 2017B 期よりフローセルを HAXPES 装置に取り付けての技術検討が計画されているが、その前に BL46XU の放射光を用いて十分な X 線照射耐性試験を行うことが必要と思われるため、JASRI の装置担当職員と緊密な連携のもと開発計画の見直しを行うことを強く勧める。

[実験責任者による研究概要]

電気化学とは、電解質溶液中において電極電位を制御しながら電子の授受を行い、酸化・還元反応を進行させる学問・技術分野である。電池、燃料電池、半導体デバイス、メッキ、腐食・防食、生物電気化学、電気化学センサー、金属精錬、電解合成など、科学・産業の根幹を担っている。電気化学反応を利用した学問分野・産業領域は膨大であり、今後ますます発展していくと予想されている。これら電気化学環境下の電極物質の構造・電子状態の解析は、もっぱら「閉鎖系」で行われており、測定中における反応物の供給は、原則的にはできなかつた。一方で、電気化学反応を定常的に進行させるためには、電極に反応物を供給し続けることが必要である。そこで、反応物連続供給により「電気化学チャンネルフロー法」で電極反応速度を厳

密に測定しながら電極物質の電子状態を HAXPES で解析し、電気化学速度論と電子論を実験的に融合することが可能な装置を開発することを目的とする。

本申請においては、1 年目に電気化学フローセルを超高真空チャンバーと一体化し、電極反応速度の厳密測定と同時に電極試料の HAXPES が可能な今までにない画期的な装置の開発を行う。ビームラインは BL46XU を用いる。本装置の完成した 2 年目には、反応中の燃料電池触媒の operando 解析を行う。

電気化学と HAXPES の同時測定を可能とするために、厚さ 30 nm 程度の Si_3N_4 製のウィンドウを用いる。ウィンドウの片側が溶液、別の側が超高真空である。溶液を流通させない状態では、このウィンドウは安定で、HAXPES 測定が可能であることは、既に報告されている。本研究において、電気化学フローセルの流通溶液が万が一真空槽中に入るとその後の SPring-8 における測定に重大な支障をきたすため、ウィンドウは水圧・真空とともに放射光照射に対して十分な耐久性を持つことが必要である。そのために、真空槽と電位化学フローセルを実実験とまったく同じ状態に設定し、放射線照射をしながら「溶液/真空+放射光耐久試験」実施し、実測定中にウィンドウの破損がないことを確実にする。溶液漏れ以外の問題もないことを十分に確認した後、BL46XU の上部フランジを利用して、本機構を取り入れた測定装置を取り付ける。測定試料には、山梨大学で合成した燃料電池用白金・コバルト合金触媒を用いる。触媒ナノ粒子の直径は 2~5 nm の任意の大きさで、コアには白金とコバルトが均一に分布しているが表面約 2 層は白金でおおわれている。粒径制御のみならず、カーボン担体上への均一分散性制御が極めて高いレベルで実現されている。本触媒は高い酸素還元反応 (ORR) 触媒能と耐久性を持ち、次世代の燃料電池触媒の担い手として期待されているが、反応中の構造および電子状態については、全くわかっていない。そこで、酸素濃度を規定した任意の温度 (室温-90°C) の水溶液を様々な溶液速度で導入し、電極の電位を自然電位から負側に変化させて ORR 速度を測定しながら、Pt および Co の HAXPES 測定を同時に行う。Pt は ORR 反応を主としてつかさどる元素であるが、反応中の Pt の酸化状態に関する情報は全くない。また、第 2 成分である Co が、反応中 Pt にどのような影響を与えているかも、推論の域

を出ない。様々な合金触媒の反応速度を測定しながら operando 測定により、電子状態に関する ORR 活性の向上因子が得られることになる。将来的には HAXPES に加えて XRD、XAFS、SAXS 測定などを行い、合金組成、構造、電子状態、表面吸着種の同定と定量などを operando 測定する計画でいる。さらに、加速劣化試験を行いながら上記測定を行うことにより、劣化メカニズムも明らかとなる。これにより、高活性・高耐久性燃料電池用触媒の一般的原理が導き出されると期待される。

本申請では、燃料電池に応用内容を絞ったが、ここで開発される装置は、電気化学反応を利用したほぼ全ての分野で適用可能なものとなる。国内外の研究開発に大きく寄与することが期待される。

－ 採択課題 4 －

課題名	Application & Development of Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy (NRVS) and Synchrotron Mössbauer Spectroscopy of Iron-Hydrogen Interactions in Hydrogenases, Nitrogenases, and Model Complexes
実験責任者名 (所属)	Stephen Cramer (University of California, Davis)
採択時の課題番号	2017A0141
ビームライン	BL09XU
審査結果	採択する

[審査コメント]

The principal investigator developed the technique of NRVS (Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy) and his group has been applying it to iron-containing enzymes in Long-Term projects over several years. They have produced significant results and contributed much to understanding of the reaction mechanisms of these enzymes. In this Long-Term proposal, the PI proposes to focus on iron-hydrogen bonds in intermediate states of hydrogenases and nitrogenases. The committee highly appreciates the past achievements of the PI and considers the project worthy of beamtime for the next two years. On the other hand, since the NRVS technique has been established, this can be regarded as just a routine measurement that requires a large amount of beamtime. In the interview, the PI explained the technical developments to reduce the measurement time. Thus, the committee recommends the PI to apply for external funding

to achieve these improvements, together with the left-over technical developments from the last Long-Term project, in collaboration with the SPring-8 staff. This will be the most efficient way to get the data the PI needs without sacrificing too much beamtime of other users.

[実験責任者による研究概要]

At beam line BL09XU the principal investigator (PI) developed the use of Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy (NRVS) for analyzing iron active sites of metalloenzymes. The use of this technique has resulted in several high impact papers in Journal of American Chemical Society (JACS) as well as Angewandte Chemie and Inorganic Chemistry^[1-4]. The research was focused on enzymes such as nitrogenase (N₂ase), [FeFe] hydrogenases (FeFe-H₂ases), [NiFe]-hydrogenase (NiFe-H₂ase), and WhiD. Most recently we have been focused on analyzing Fe-H/D bending modes in model compounds and H₂ase enzymes. Fe-H/D modes are weak and thus development of NRVS technique is necessary in order further the study of these enzymes. We hope that future collaboration with SPring-8 will allow us to push the boundaries of NRVS. In addition, we are also focused on collecting data at higher energy region to analyze Fe-H/D stretching modes (>1000 cm⁻¹). We hope to work on technique development in collaboration with scientist at beam line BL09XU. Our goal is to increase the count rates by two fold without loss of resolution, increase the count 2x by increasing the size of the APD or by using double sided detection, and developing a cosmic ray anti-coincidence system to reduce background count rates with the help of scientist at SPring-8.

This proposal aims to use the nuclear resonance vibrational spectroscopy (NRVS) to study the structure and dynamics of Fe-S proteins. NRVS is a spectroscopic technique that probes vibrational sidebands from a nuclear excited state transition in Mössbauer active nuclei, in our case ⁵⁷Fe. NRVS exploits nuclear resonant absorption with recoil to reveal vibrational dynamics of the resonant nuclei using high flux and high monochromation (0.8 meV). It yields vibrational spectra for all the normal modes involving Fe motion, making it highly selective and valuable technique.

Iron-sulfur [Fe-S] clusters are ubiquitous and evolutionary ancient prosthetic groups that are required to sustain fundamental life processes, including electron transfer within and between proteins, catalysis of chemical reactions, sensing of the chemical environment, regulation of DNA expression, repair of damaged DNA, and maintenance of molecular structure^[5]. Our research in this proposal involves three critical Fe-S proteins: (1) MoFe and VFe nitrogenases (N₂ase)-responsible for biological nitrogen fixation and supplies the chemically reactive N needed for building proteins and nucleic acids^[6]. (2) NiFe and FeFe-hydrogenases(H₂ase) -the production or consumption of molecular H₂ which is as fast as the best artificial fuel cells, but uses earth-abundant Fe instead of rare and expensive Pt. (3) WhiD proteins for NO and O₂ sensing.

The NRVS studies from our previous proposal obtained significant NRVS results for many important enzymes. One of the most important results is our observation of Fe-H/D bending modes in NRVS for H₂ases and N₂ase which are considered among the weakest vibrational modes.

References

- [1] Serrano, P. N.; Wang, H.; Crack, J. C.; Prior, C.; Hutchings, M. I.; Thomson, A. J.; Kamali, S.; Yoda, Y.; Zhao, J.; Hu, M. Y.; Alp, E. E.; Oganessian, V. S.; Le Brun, N. E.; Cramer, S. P.: "Nitrosylation of Nitric-Oxide-Sensing Regulatory Proteins Containing [4Fe-4S] Clusters Gives Rise to Multiple Iron-Nitrosyl Complexes.", *Ang. Chem. Int. Ed.* **2016** 55 (47) 14575-14579.
- [2] Gilbert-Wilson, R.; Siebel, J. F.; Adamska-Venkatesh, A.; Pham, C. C.; Reijerse, E.; Wang, H.; Cramer, S. P.; Lubitz, W.; Rauchfuss, T. B.: "Spectroscopic Investigations of [FeFe] Hydrogenase Maturated with [⁵⁷Fe₂(adt)(CN)₂(CO)₄]²⁻", *J Am Chem Soc* **2015** 137 (28) 8998-9005.
- [3] Ogata, H.; Krämer, T.; Wang, H.; Schilter, D.; Pelmenschikov, V.; van Gastel, M.; Neese, F.; Rauchfuss, T. B.; Gee, L. B.; Scott, A. D.; Yoda, Y.; Tanaka, Y.; Lubitz, W.; Cramer, S. P.: "Hydride bridge in [NiFe]-hydrogenase observed by nuclear resonance vibrational spectroscopy.", *Nature Comm.* **2015** 6 7890-7897.
- [4] Reijerse, E.; Pham, C. C.; Pelmenschikov, V.; Gilbert-Wilson, R.; Adamska-Venkatesh, A.; Siebel, J.; Gee, L. B.; Yoda, Y.; Tamasaku, K.; Lubitz, W.; Rauchfuss, T. B.; Cramer, S. P.: "Direct observation of an iron bound terminal hydride intermediate in [FeFe] hydrogenase.", *Journal of the American Chemical Society* **2016** submitted, under review.
- [5] Johnson, D. C.; Dean, D. R.; Smith, A. D.; Johnson, M. K.: "Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters.", *Annual Reviews of Biochemistry* **2005** 74 247-281.
- [6] Yagi, T.; Higuchi, Y.: "Studies on hydrogenase.", *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences* **2013** 89 (1) 16-33.