

生体分子の軟 X 線自然円二色性

中川和道

田中真人

安居院あかね

神戸大学発達科学部 〒657-8501 神戸市灘区鶴甲 3-11

産業技術総合研究所：計測フロンティア研究部門

〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 つくば中央第二

日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門放射光科学研究ユニット

〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

要旨 生体分子の自然円二色性はこれまで主に可視紫外領域で観測されてきたが、軟 X 線領域では自然円二色性の信号強度は X 線吸収端近傍構造の信号強度の約 0.1% と小さく、技術的困難が大きいため測定はなされて来なかった。今回我々は、軟 X 線領域の偏光制御技術を利用し、世界で初めて生体分子の軟 X 線領域における自然円二色性の観測に成功した。軟 X 線 NCD は軽元素を元素選択して観測できるため、特にタンパク質、DNA といった生体高分子の構造情報を、原子近傍の構造に特化して得ることができ、従来の可視紫外領域の NCD よりも詳細な構造情報を得られる有利さがある。そのためその構造解明は新規の医薬品開発等に大きな知見を与え、各種疾病の予防や治療に大きな貢献をもたらすものと期待されている。今回の成果は創薬や生命起源の研究に有益なヒントを与えるものである。

1. はじめに

光の基本的性質のひとつに、垂直・水平直線偏光や左右(楕)円偏光という偏光性をあげることができる。これらの偏光に対する物質の応答は、物質の構造解析や光学定数の詳細な決定など様々な面において研究され、また利用されている。とくに生物を形づくる生体分子の多くは光学異性体をとるカイラリティーをもち、左右円偏光に対する光学応答が異なる。左右円偏光に対する屈折率の違いは旋光性(または円複屈折)、光吸収係数の違いは円二色性(Circular Dichroism: CD)と呼ばれ、古くから盛んに研究されてきた。本誌の読者には、強磁性体において光磁気効果がもたらす磁気円二色性(Magnetic Circular Dichroism: MCD)に関する研究についてご存知の方も多いと思う。MCD ではその CD の起源に磁気に関与しているのに対し、生体分子の CD は光学異性体のカイラリティーそのものにより生じている。特に外場を何も与えない自然のままの状態がもたらす円二色性という意味を強調し MCD と区別して自然円二色性(Natural Circular Dichroism: NCD)と呼ぶ。

カイラリティーをもつ分子や結晶が旋光性や NCD を呈することはよく知られている。歴史的には、まずこれらの光学的な性質が発見され、Biot¹⁾、Pasteur²⁾、Cotton³⁾らをはじめとする多くの研究者により二世紀近い年月をかけて旋光性や NCD の起源を明らかにするための研究が積み重ねられ、それが構造的なカイラリティーに起因することが解明された。そしてさらに NCD が生じるメカニズムは何

かという基礎研究や、主に生体分子を対象とする構造解析のツール開発をめざす応用研究などが盛んに展開されていた⁴⁾。精力的な研究は多くの成果をもたらした。例えば、生化学を学ばれた人なら存じておられるであろう「タンパク質の NCD スペクトルを測定して波長 194 nm 付近に負の CD が観測されたならばタンパク質の構造はランダムコイル構造に、194 nm 付近に正の CD ならば β 構造に、190 nm 付近に正の CD と 205 nm 付近に負の CD が観測されたならば α -ヘリックス構造に同定できる。」という今日でも広く利用されている規則が実験的に確立された⁵⁾。これらの実験事実は後に Woody⁶⁾、Tinoco⁷⁾、Vournakis⁸⁾、Urry⁹⁾らによって理論的な裏づけが与えられた。

現在、NCD 測定はタンパク質を中心と生体分子の構造研究など多くの分野で非常に広く利用されている。特に生体高分子機能は、分子のカイラリティーが完全に偏極したホモカイラリティー状態になっていることとの関連が深い。カギとカギ穴に例えられるように生体の高度な生化学反応を間違ふことなく遂行するのはタンパク質である。この機能が働くためにはタンパク質の構造が安定でなければならない。タンパク質の構成要素であるアミノ酸には、4 個の互いに異なる元素または基と結合している炭素原子、すなわち不斉炭素、があるため、カイラリティーをもつ。それらの基のつき方により L-アミノ酸(L 体)と D-アミノ酸(D 体)という 2 種類の光学異性体がある。生体内でタンパク質を構成している 20 種類のアミノ酸は生体アミノ酸と呼ばれ、グリシンを除く 19 種類がカイラリティー

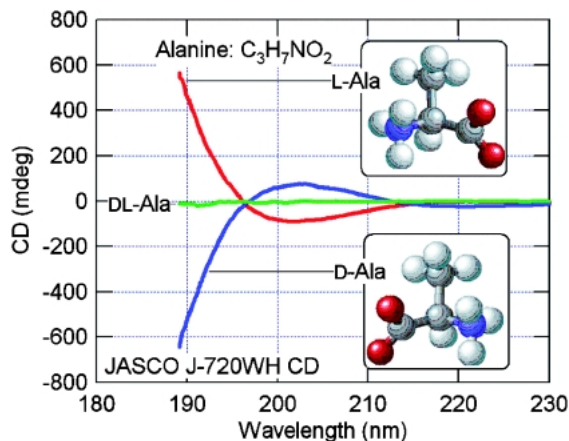


Fig. 1 Far-UV NCD spectra of L-, D- and DL-alanine films¹²⁾ measured with a conventional CD spectrophotometer (JASCO J720WI).

を有し、L体、D体の光学異性体が存在する。ところが、生体中のタンパク質に含まれているアミノ酸はL体のみであり、このことがタンパク質の構造を安定にしている。もしD-アミノ酸が混在していると、タンパク質の構造に極めて不安定となるカイラル欠陥とも呼ぶべき欠陥が生じるため、生体の高度な生化学反応が進行せず、最終的には生物の生命活動そのものが成り立たなくなる。

このように、生体アミノ酸がホモカイラリティーを有することは、生命にとって不可欠である。ホモカイラリティー成立の起源を探ることは、生命の起源を探る上での要石であると言われる所以である。筆者のうち中川^{10,11)}はこの観点から生命の起源に興味をもって研究を展開している。

Fig. 1に、市販されている円二色分散計 (JASCO, J-720WH) で測定されたアラニン (Ala: $C_3H_7NO_2$) 薄膜の遠紫外領域でのNCDスペクトル¹²⁾を示す。L体とD体とで絶対値は等しいが符号が互いに反対のスペクトルとなり、DL体ではスペクトルは平坦で構造を示さない。この実験結果は一般的な可視紫外域のNCDスペクトルの特徴であり、我々はこの特徴が軟X線領域のNCDスペクトルにも成り立つという大前提のもとに研究をすすめた。

NCDスペクトルの測定は、これまで主に赤外から紫外領域で、研究室に設置できる装置を用いて行われてきた。ところが前述のたんぱく質の例で α -ヘリックスのCDピークが190 nmに観測されたように、アミノ酸の光学遷移の振動子強度の主要な部分は200 nmより短い真空紫外域に存在する。例えば Fig. 2に放射光を用いて測定されたフェニルアラニン (Phe: $C_9H_9NO_2$) の吸収スペクトルを示す。真空紫外域には化学結合に関わる価電子の π および σ 共鳴やイオン化による強い吸収構造が観測され、真空紫外域のNCDの研究が重要であることを示している。

真空紫外域におけるNCDの研究が進展するのには、放射光がほとんど決定的な役割を果たした。Brookhaven研

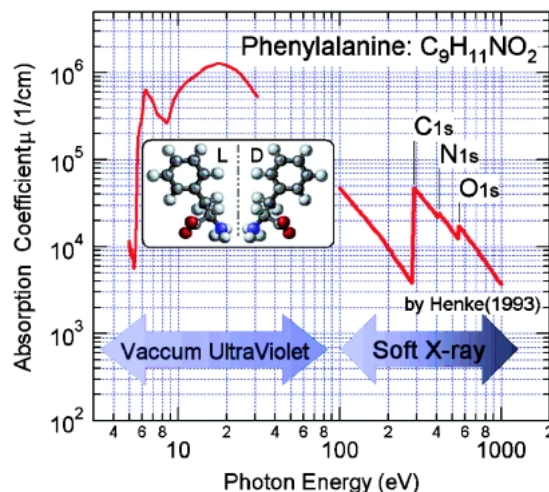


Fig. 2 Absorption coefficient of a bio-molecule, phenylalanine. 5–30 eV: Our experimental result. 100–1000 eV: Calculated result of available optical constants of atoms by Henke (1993)⁴⁴⁾.

(USA)のSutherlandらのグループ¹³⁾は、偏向電磁石から発生する放射光が軌道面内に直線偏光していることを利用し、その直線偏光真空紫外光を光弾性変調子 (Photoelastic modulator; PEM)に通して右円偏光と左円偏光を切り替え、140 nmという短波長までのNCDスペクトルの測定を実現した。広島大学のGekkoらのグループ^{14,15)}もHISORにおいて同様の手法で140 nmの短波長までの溶液試料のNCDスペクトルの測定を実現した。Bonn大学 (ドイツ)のHormesらのグループ¹⁶⁾も気体試料を用いて160 nmまでのNCDスペクトルの測定に成功した。この方法は光源として放射光を利用していることを除けば市販のNCD測定法とほぼ同じものである。現在このPEMと放射光の組み合わせを用いた真空紫外域でのNCD測定ビームラインが世界各地に建設され^{17–19)}、主にたんぱく質の二次構造解析などに利用されている^{20–22)}。ただしこれらの装置では、透過型のPEMを用いているため、原理的には光学素子の吸収の始まる波長105 nm (実際には波長140 nm程度)が短波長限界となる。

また硬X線領域では最近ダイヤモンドの位相子を利用することによって左右円偏光を変調させてCDスペクトルを測定することが可能²³⁾となっており、SPring-8 BL39XUなどで既に利用が可能である^{24–26)}。

真空紫外域や軟X線領域といった透過型光学素子の利用が困難な領域では、偏向電磁石放射の上部と下部がそれぞれ左右円偏光になっていることや、光源として円偏光アンジュレーターを利用することでNCDスペクトルの測定が試みられてきた。これらの方法の長所は、光源からの光がもともと(楕)円偏光になっており、透過型の光学素子を用いないので、波長に関係なく円偏光が得られる点にある。

産業技術総合研究所（旧電子技術総合研究所）では、Onuki ら²⁷⁾によって開発された直交磁場型偏光可変アンジュレーターを用いた105 nm 以下の真空紫外域にも対応した NCD 測定システム開発が渡辺一寿博士らと筆者の中川と田中らによって行われている²⁸⁻³⁰⁾。この直交磁場型偏光可変アンジュレーターは2組の互いに直交した磁石列から成り、お互いの位相を調節することによって左右円偏光や直線偏光を発生することができる。位相駆動はモーターによる機械的スイッチングによって行い、最高5 Hz、通常2 Hzの偏光切り替えが可能である。現在120 nm までの真空紫外域での NCD 測定に成功しており、現在は100 nm 以下の測定を目指している。この研究に関しては別の文献²⁸⁻³⁰⁾を参照してほしい。

また ESRF（欧州連合）では偏光可変アンジュレーターを用いて、Goulon ら³¹⁻³³⁾が主に結晶試料の硬 X 線領域における NCD などを測定することに成功した。彼等は左右円偏光照射時における試料の吸収係数に相当する蛍光収量スペクトルを測定し、その差分を取ることで NCD スペクトルの測定に成功した。また彼等³⁴⁾は偏向電磁石放射を利用して、キラル金属錯体試料の軟 X 線領域（チタン L 殻）での NCD 研究の端緒的な結果を得た。

アンジュレーターを用いた NCD 測定は今後いろいろな放射光施設で新たな試みの対象となっていく可能性がある。本稿で述べる軟 X 線領域での測定は、SPring-8 BL23SU の可変偏光型挿入光源を用いて行った。測定の詳細³⁵⁾は2.2章で述べる。また SPring-8 の BL25SU^{36,37)}でも、NCD 測定をめざす計測系の調整が進んでいる。BL25SU では、挿入光源を二台設置し、各々の光源を通る蓄積電子の軌道をキッカーで電気的に制御して10 Hz 及び1 Hz で左右円偏光を切り替え、これにタイミングを合わせて光子エネルギーを挿引して信号計測を行う方式が採用されている。キッカーを用いる方法は偏光切り替えを高速で行うことができるが、光源が二点あるので光源点が重なるように挿入光源を調整する必要がある。

NCD の実験的研究の一方、理論的理解も進められている。電子遷移に起因する NCD は、光学遷移の電気双極子モーメントと、遷移磁気双極子モーメントあるいは電気4重極子モーメントとの干渉で書き表される^{38,39)}。準位 a から準位 b への電子遷移では、光学遷移の電気双極子モーメントと遷移磁気双極子モーメントの干渉に起因する NCD の強度は遷移行列要素の積 $\langle a | \mu_e | b \rangle \cdot \langle b | m_e | a \rangle$ の虚数項で与えられ E1M1 過程と呼ばれる。また、光学遷移の電気双極子モーメントと電気4重極子モーメントの干渉に起因する NCD の強度は遷移行列要素の積 $\langle a | \mu_e | b \rangle \cdot \langle b | Q_e | a \rangle$ の虚数項で与えられ E1E2 過程と呼ばれる。群論の言葉で言えば、対称心をもつ分子では反転に対して対称な表現に属する固有状態（以下、対称な固有状態と略記）と反対称な表現に属する固有状態間で E1 遷移は許容となり、M1 遷移は対称な固有状態と対称な固有状態との

間、および反対称な固有状態と反対称な固有状態との間で許容となる。E1M1 過程の遷移行列要素は、回映対称をもたない点群すなわち掌性の点群でだけゼロにならず、遷移は許容される。

可視紫外域の生体分子の NCD は、その全てが E1M1 過程で説明されてきた。また数少ないが E1E2 過程で説明された可視紫外域の NCD スペクトルの例として、Barron⁴⁰⁾らが測定したコバルトトリスエチレンジアミン錯イオン Co(en)_3^{3+} 結晶などがあげられる。一方、硬 X 線領域では、Goulon ら³¹⁾は錯体イオンの NCD スペクトルを測定し、その起源を E1E2 過程で説明した。E1M1 過程か E1E2 過程かを決定する要因は、上に述べたその系のもつ対称性と、遷移のエネルギーの大きさの2つがある。電磁波のエネルギーが高くなるとその波長は短くなり、相互作用する分子内部の電子密度の不均一さの距離と同程度になる。すると電気4重極子モーメントの寄与が大きくなり、エネルギーの高い硬 X 線領域では E1E2 過程の断面積は大きくなると考えられる。Goulon ら^{32,41)}の硬 X 線 NCD の測定結果が E1E2 過程で説明された背景にはこのことがあろう。軟 X 線領域では、電磁波の波長は硬 X 線の場合よりも長いので電気4重極子モーメントの効果は硬 X 線の場合よりも小さくかつ可視紫外よりも大きいと考えられるが、実験的検証が困難であったことから研究は進んでいない。軟 X 線領域の NCD は、E1M1 過程主体の可視紫外領域から E1E2 過程主体の硬 X 線領域へと NCD のメカニズムが移っていく遷移領域の NCD の現象であると期待され、実際に Linköping 大学（スウェーデン）の Ågren らのグループ^{42,43)}によって E1M1 過程を基にした理論計算の報告があるが、いまだ実験結果の報告はほとんどなく未開拓の研究分野と言える。

軟 X 線は波長が短く、そのエネルギーは物質の化学結合エネルギーと同程度になる。生体分子を構成する主要元素である炭素、窒素、酸素の1s 電子の束縛エネルギーは Fig. 2 に各原子の既知の光学定数⁴⁴⁾を用いて計算された原子の光吸収係数のスペクトルで示されるように軟 X 線領域にある。炭素、窒素、酸素の局在した内殻電子である1s 電子を軟 X 線により励起したときに起こる吸収過程は双極子選択則に従い、それぞれの2p 空軌道の電子状態を反映する。ところが炭素、窒素、酸素という軽元素では2p 軌道が価電子として分子軌道を形成しているため、光学遷移の終状態は分子全体に広がっている。軟 X 線領域において NCD が観測される理由は、この終状態がカイラリティーをもっているからに他ならない。例えば、Phe の窒素原子1s 電子の光学遷移の終状態は、Fig. 3 にイメージをやや誇張して示したように、L 体の中の窒素原子と、D 体の中の窒素原子では鏡映対称になっており、これが左右円偏光に対する吸収強度の差として観測されると考えられる。軟 X 線は物質との相互作用が強いため NCD の発現機構に関する基礎的研究がすすめば、NCD によって光学異

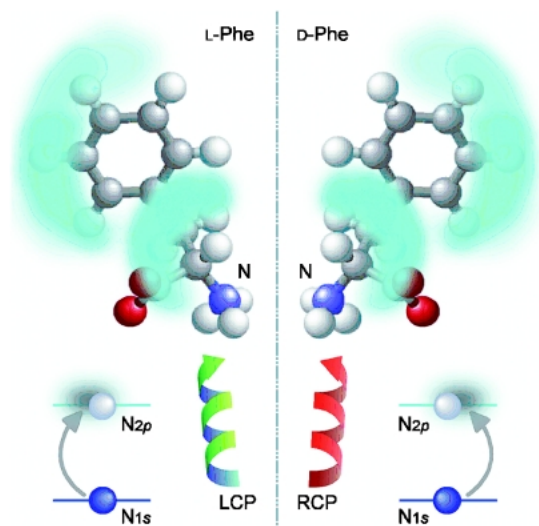


Fig. 3 Schematic illustration of electronic transition responsible for NCD.

性を識別し光化学反応を制御するのに応用できる可能性がある。

本稿では、生体分子のカイラリティーによる軟 X 線領域での NCD に焦点を当てて論じ、また今後の課題を展望する。これは我々が初めて成功した生体分子の軟 X 線領域での NCD スペクトルの例である。

2. 実験

2.1 試料作製

生体分子の軟 X 線 NCD スペクトルの測定は、アミノ酸を試料に選びその薄膜を作製して実験を行った。前述したように生体アミノ酸には L 体、D 体の光学異性体が存在し、生体アミノ酸の L 体、D 体とそれらの等量混合物であるラセミ体（本稿では DL 体とも書く）は容易に入手可能である。NCD はその強度が約 1~0.1% 程度という非常に微弱な信号であるため、絶対値は等しいが符号が互いに反対のスペクトルを示す L 体と D 体、そして信号を示さない DL 体の NCD スペクトルを比較することによって、ノイズと信号を区別して正確な NCD 測定を行うことができる。特にまだ黎明期の軟 X 線 NCD 研究において、これは必須の事項であると思われる。またアミノ酸は比較的分子量の小さい分子であり、理論計算が可能である。前述の E1M1 過程に基づいて、軟 X 線領域でのアミノ酸分子の NCD の理論的予測が Ågren らのグループ^{42,43)}によってすでになされた。我々は、彼らの計算結果の中でも強い NCD を示すと予想された Phe の窒素 K 殻 NCD とセリン (Ser: C₃H₇NO₃) の酸素 K 殻 NCD を最初の観測対象に選択した。

NCD 強度は弱いことが予想されるので、なるべく多くの測定を繰り返し行うことでスペクトルの統計精度をでき

る限り高める必要がある。しかしながらアミノ酸は軟 X 線によって非常に壊れやすいため、測定毎に試料位置を変化させる必要がある。各測定位置においても常に一定の測定条件を得るため、我々は試料形態として均一な薄膜を採用した。

これらのアミノ酸薄膜は抵抗加熱真空蒸着法を用いて BeCu 基板上に約 300 nm の厚さで作製した。アミノ酸粉末試料は市販のものをそのまま使用した。この際、精製などは特に行わなかった。アミノ酸の熱分解を防ぐために真空蒸着は約 100°C という低温条件下で行い、かつ作製した複数枚の薄膜のうちの 1 枚を水溶させて高速液体クロマトグラフィーで分析し、蒸着時に熱分解が起きていないことを確認した。アミノ酸薄膜作製の詳細に関しては既報^{11,12)}を参考にされたい。

軟 X 線放射光による実験のように高真空中における実験設備の多くでは、低分子有機物は真空を汚染するために敬遠される。しかしアミノ酸は予想に反してその蒸気圧が低く (10⁻⁸ Pa 以下)、高真空中での実験に十分に耐えることが分かった。アミノ酸は固体中では両性イオンとして存在していることが知られており、固体中で隣接する両性イオン間の負電荷と正電荷とがクーロン力で引き合っているためこのように低い蒸気圧を示すものと思われる。このように強い力で結びついているアミノ酸が 100°C 程度の熱で容易に蒸着できてしまうこともまた予想に反していた。さらにこの両性イオンとして存在していることは、次章で述べる NCD 測定とそれに先立つ X 線吸収端近傍構造 (X-ray absorption near edge structure: XANES) の測定にも有利となった。軟 X 線領域での XANES 測定法として簡便な方法の一つである表面電流測定による全電子収量法は、一般には絶縁体への応用は困難である。実際、一般的な有機分子の測定では数 nm 程度の膜厚しか許されない。ところがアミノ酸は両性イオンであるためか電流が流れやすく、膜厚を 1 μm 程度と厚くした場合でもチャージアップの効果がほとんど無くきれいな XANES スペクトルが測定できた。この膜の厚さは光分解による分子数の減少や基板の露出などによる測定途中でのスペクトルの変化を軽減する効果もあった。また試料に異方性がある場合、その NCD 測定は困難になることが知られているが⁴⁵⁾、我々の作製した薄膜はマクロにみて一様である¹²⁾ため、異方性の寄与等を考慮することなく NCD を測定することができた。

以上のようにアミノ酸は、1) L, D, DL 体が容易かつ安価に入手できる、2) 理論計算が先行している、3) 高真空実験が可能、4) 表面電流測定が容易に可能などの理由において、最初の軟 X 線領域での NCD 測定に適切かつ準備し易い試料である。

2.2 測定方法

本項で紹介する軟 X 線領域での NCD スペクトルの測定

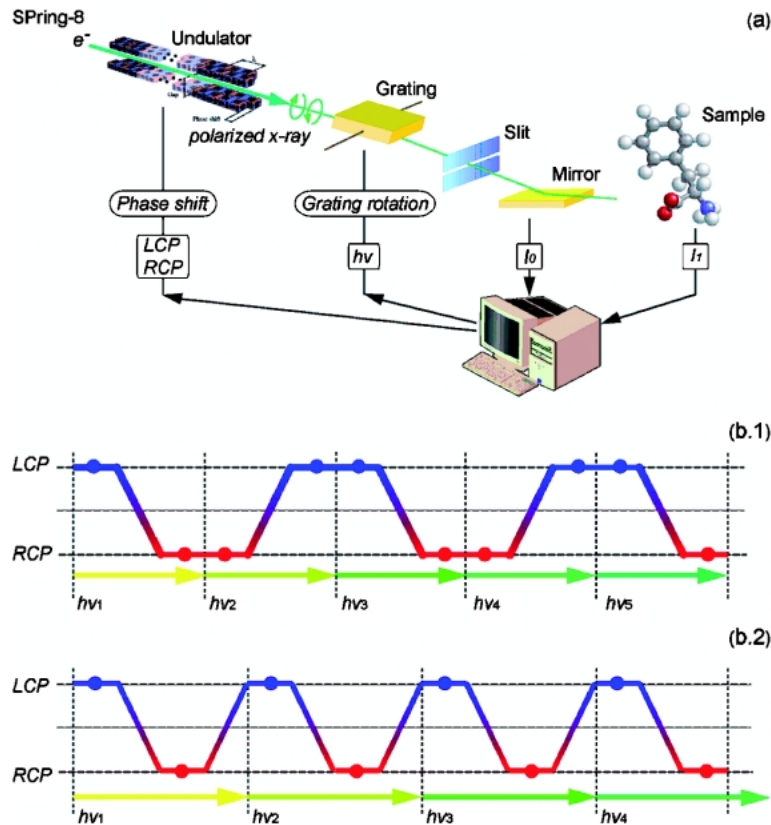


Fig. 4 Experimental configuration (a) and procedure (b) of measurement of NCD spectra.

は、大型放射光施設 SPring-8 の軟 X 線ビームライン BL23SU⁴⁶⁻⁵⁰⁾において、室温（およそ 300 K）で全電子収量法によって行った。測定系全体の概念図を Fig. 4 (a) に示す。全電子収量法は、試料に照射した X 線によって放出される光電子またはオージェ電子の数に応じて試料に流れる全電流 (Fig. 4 (a) 右, I_1) を計測する方法である。軟 X 線は試料面に垂直に入射し、スポットサイズはおおよそ横 1 mm × 縦 0.5 mm であった。また、試料前後の全電子収量 (Fig. 4 (a) 中ほど, I_0) を測定し、これを入射光強度（に比例する量）とした。 I_1/I_0 を規格化された吸収強度 (A) とした。左右円偏光照射時における吸収強度 (A_L , および A_R) を測定し、それらの単純な差分 ($A_L - A_R$) を NCD 信号とした。

自然円二色性測定では、入射光の偏光を右円偏光と左円偏光に切り替えることが必須である。BL23SU には挿入光源として APPLE-2 型可変偏光アンジュレーター (ID23) が設置されている。この型の挿入光源は Fig. 4 (a) 左上に図示されているように上下各 2 列、計 4 列の磁石列をもつ。この磁石列の位相を制御することで放射光の偏光を任意に変えることができる⁴⁹⁾。このため光源点は一点と考えることができる。また、BL23SU の分光器⁵⁰⁾には不等間隔回折格子が採用されており、回折格子を回転することによってスリットから取り出す分散光の波長が変わり (Fig. 4 (a) 中ほど)、比較的単純な制御でエネルギー挿

引できる^{46,47)}。

軟 X 線領域の NCD 測定で検出を目指す信号強度は極めて微弱である。そのため入射光の偏光、エネルギー、スポット位置、強度、及び試料電流を精度よく制御しかつ測定しなければならない。右円偏光と左円偏光それぞれの吸収スペクトルの強度差を測定するには、右（あるいは左）円偏光での吸収スペクトルを測定し終わったあと、左（あるいは右）円偏光での吸収スペクトルを測定する手順がもっとも簡便であるが、この手順ではエネルギー挿引に関する分光器の機械精度や、左右それぞれの円偏光に対する吸収強度の計測時点の時間差など、信号精度を劣化させる要因が入り込み易くなる。これを抑制するには偏光反転とエネルギー挿引の組み合わせのタイミングを工夫することが有効である。

Fig. 4 (b) に、偏光反転、エネルギー挿引、吸収強度測定の手順の例を示す。例えば Fig. 4 (b.1) の場合、まず入射光を左円偏光にし、また光子エネルギーを $h\nu_1$ にして A_L を測定する。さらにエネルギーはそのまま偏光を右円偏光に反転し A_R を測定する。次に偏光はそのままエネルギーを $h\nu_2$ に変え A_R を測定、さら偏光を反転し A_L を測定する。続けて、偏光はそのままエネルギーを $h\nu_3$ に変え A_L を測定し、さらに偏光を反転し A_R を測定する。このような手順を繰り返す（左・右→右・左→左・右→…）測定し、エネルギーが同じで偏光が右円偏光と左円

偏光とを反転させることで得られたそれぞれの吸収強度 A の差が NCD スペクトルとなるこれとは別に Fig. 4 (b.2) のようにエネルギー挿引ごとに偏光反転する (左・右→左・右→左・右→…) 手順も考えられる。この手順では信号計測時に先になる偏光に片寄りができてしまう。また Fig. 4 (b.2) の手法は、偏光反転の頻度が Fig. 4 (b.1) より多くなる。ID23の場合、偏光反転は挿入光源の磁石列に設置されたモーターを駆動して磁石列の位相を 30 mm/sec の速度で機械的に動かして行うため、切り替えに数秒を要する。このため Fig. 4 (b.1) のほうが全体として計測時間が短くできる。実際の測定は、Fig. 4 (b.1) の手順で行った。また、統計精度を上げるために同様の測定を繰り返し、吸収強度の和平均を算出した。この同様の手順を行う際に、測定開始時の偏光が片寄らないように、左・右→右・左→左・右→…の系列での測定と、右・左→左・右→右・左→…の系列での測定の回数が同じになるようにした。例えば、Fig. 6 の測定の場合それぞれ 4 回、計 8 回測定し平均を採った。

先に述べたように本測定での偏光反転は磁石列の機械的駆動によって行った。その際、互いの磁石列には大きな吸引・反発力が働いている。このため、磁石列を右偏光から左偏光、左偏光から右偏光に動かしたときに必ずしも同じ計測条件を与えない場合があるようであった。また、挿入光源及び分光器は細心をもって整備されているが、放射光の回折格子や後置鏡にある僅かなミスアライメントなどがあれば、 I_0 や I_1 に反映され、信号の精度を下げってしまう。本研究では、左・右→右・左→左・右→…の系列による測定と、右・左→左・右→右・左→…の系列による測定を組み合わせる測定の手順に偏りがないようにし、測定器の機械的精度から混入してくる要因を打ち消すように工夫した。第 1 章でも紹介したように Goulon ら³¹⁾は硬 X 線領域での NCD スペクトル測定の先駆的実験を報告したが、彼等も測定信号の統計精度を上げるために測定手順に同様の工夫をしている。

また、試料周りの真空ポンプからの振動など、他の精度劣化の要因も排除した。さらに試料の光分解による劣化の影響をさけるため、入射光が長時間同じ場所に照射されないように、測定ごとに試料位置を数 mm ずつ移動した。これが可能であったのは、試料作成の項で述べたように均一な蒸着膜が作成できたからであった。軟 X 線領域での NCD 測定で期待される信号強度は極めて微弱であるが、以上に述べたような方法をもって精度を上げるように工夫した。

3. 実験結果および考察

Fig. 5 に Phe の窒素 K 殻近傍で測定した (a) ; XANES スペクトル, (b) ; A_L-A_R スペクトルの実験結果, (c) ; Yang ら⁴³⁾による NCD スペクトルの理論計算結果をそれ

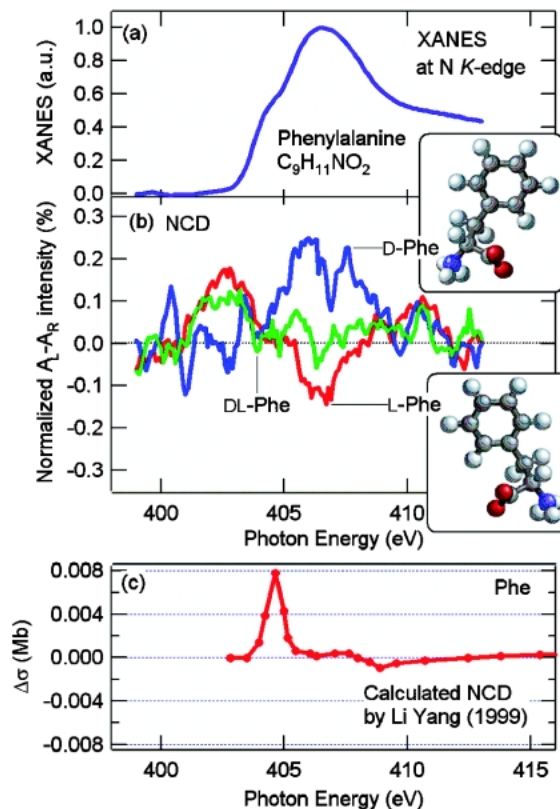


Fig. 5 (a) Normalized XANES spectrum of L-Phe film near the nitrogen K-edge. (b) Normalized A_L-A_R spectra of Phe films. Red line: L-Phe. Blue line: D-Phe. Green line: DL-Phe. (c) Calculated NCD of Phe by Yang *et al.* (1999)⁴³⁾.

ぞれ示す。XANES スペクトルの最大ピーク強度が 1 になるように規格化を行い、その規格化定数を Fig. 5 (b) の A_L-A_R スペクトルにも乗算した。正確な NCD 強度の算出には実際の円偏光度で除算する必要がある。しかし本実験ではまだそれほどの精度が得られていないことと斜入射光学系では円偏光度の低下は少ないとみなせることなどから、円偏光度を 1 として NCD 強度を算出した。

Phe は分子式 $\text{NH}_3^+\text{CH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ で表わされ、分子中に窒素原子をただ一種類アミノ基 ($-\text{NH}_3^+$) に有する (分子構造は Fig. 5 挿入図参照)。実験の結果、Phe の窒素 K 殻近傍の XANES スペクトルは、同様に窒素原子をアミノ基の一つしかもたないグリシン ($\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COO}^-$) などとほぼ同じスペクトルとなること分かった⁵¹⁾。この窒素原子は隣接の炭素 (不斉炭素) や水素と一重結合 (σ 結合) をしており、一般的にイオン化準位より高いエネルギーレベルに反結合性の空軌道 (σ^* 軌道) をいくつかもつ。窒素原子の内殻励起によって主にこの σ^* 軌道への電子遷移とイオン化が起こる。Fig. 5 (a) の XANES スペクトルの 405 eV の肩構造は窒素 $1s$ 電子のイオン化、407 eV のピークは窒素 $1s$ 電子が励起されていくつかの σ^* 軌道へ遷移する (窒素 $1s \rightarrow \sigma^*$ 遷移) ことによるものと考えられる。

次に Fig. 5(b) に示す差分スペクトルを検討する。図から明らかなように、L-Phe の A_L-A_R スペクトルは約406 eV に負のピーク、D-Phe は正のピークを示している。それらとは対照的に DL-Phe はピーク構造を示さないことがわかる。L 体と D 体とで絶対値が等しいが符号が互いに反対の構造を示し、DL 体では構造を示さないというこの実験結果は一般的な可視紫外域の CD スペクトルの特徴と同じである。このことから我々は、観測された Phe の A_L-A_R スペクトルに現れている構造はノイズではなく NCD によるものであると結論した。406 eV の NCD ピーク強度が L 体で約 -0.1%、D 体で約 0.2% とばらつきがあるなどまだ精度の高い実験結果とはいえないものの、これは生体分子の軟 X 線領域での NCD の初めての観測結果である。また我々はこの NCD ピークを上記の XANES スペクトルとの比較から、窒素の $1s \rightarrow \sigma^*$ 遷移に帰属した。403 eV 付近にも NCD らしきピークが見えている。Fig. 4(c) の理論計算結果⁴³⁾ と比べてみるとエネルギーの絶対値や強度比の違いはあるが、実験結果とほぼ同様のスペクトルの特徴を示しており、我々の実験結果の妥当性を支持しているといえよう。ただし、この計算が L 体と D 体どちらにおいてなされたかは文献中に明示されていないため、正負に関する議論は現段階では留意を要する。

Fig. 6 には Ser について、酸素 K 殻近傍の (a) ; XANES スペクトル, (b) ; A_L-A_R スペクトル, (c) ; Plaskevych⁴²⁾ による L-Ser の NCD スペクトルの理論計算結果をそれぞれ示す。ここでも Fig. 5 の Phe と同様に XANES の最大ピーク強度が 1 になるように規格化を行い、その規格化定数を Fig. 6(b) の A_L-A_R スペクトルに乗算した。Ser の分子式は $\text{NH}_3^+\text{CH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{OH}$ であり、Fig. 6 挿入図にその分子構造を示す。Ser では先ほどの Phe のフェニル基 ($-\text{C}_6\text{H}_5$) がヒドロキシ基 ($-\text{OH}$) に置き換わっている。ここで Ser は 3 つの酸素原子を持っている。そのうちカルボキシ基 ($-\text{COO}^-$) には 2 つの酸素原子が存在するが、これらは共鳴しているため区別することはできない。つまり Ser の酸素原子はカルボキシ基に存在するものとヒドロキシ基に存在するものの 2 種類に分けられる。カルボキシ基の酸素は炭素と一重結合だけでなく二重結合 (π 結合) もしているため、空軌道として σ^* 軌道と π^* 軌道の両軌道ができる。ヒドロキシ基にはアミノ基同様に σ^* 軌道しかない。概して述べると、内殻励起の結果として、イオン化、カルボキシ基の σ^* 準位と π^* 準位、ヒドロキシ基の σ^* 準位への電子励起が生じる。

Fig. 6(a) の XANES スペクトルには、実際にいくつかのピークが観測された。グリシン^{51,52)} やメタノール⁵³⁾ など類似物質の XANES スペクトルの比較などから、532 eV のピークはカルボキシ基の π^* 準位、540 eV はヒドロキシ基の σ^* 準位、548 eV はカルボキシ基の σ^* 準位への電子遷移によると考えられる。NCD も同様にこれらの準位への電子遷移によって生じると考えられる。

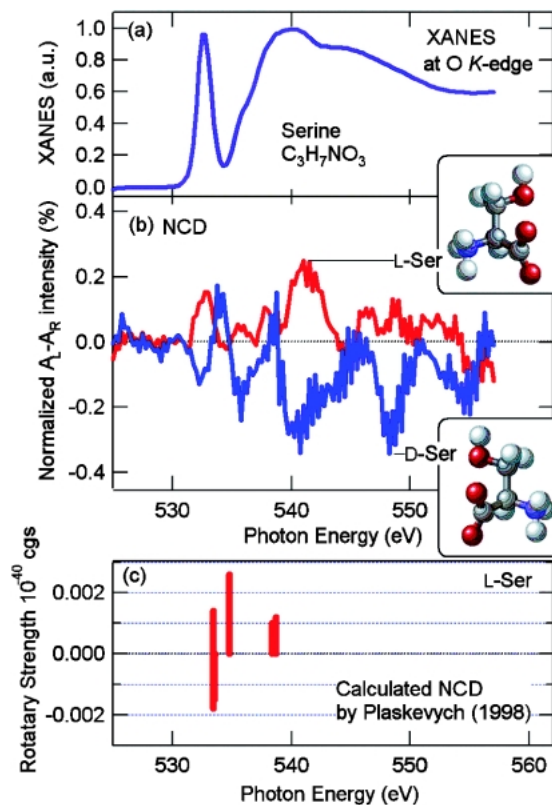


Fig. 6 (a) Normalized XANES spectrum of L-Ser film near the oxygen K-edge. (b) Normalized A_L-A_R spectra of Ser films. Red line: L-Ser. Blue line: D-Ser. (c) Calculated NCD of L-Ser by Plaskevych *et al.* (1998)⁴²⁾.

Fig. 6(b) の A_L-A_R スペクトルを検討する。L-Ser に対しては約540 eV に強い正のピーク、D-Ser では負のピークが見られ、またこれら強度もほぼ同じ (約0.25%) であることから、このピークも Phe 同様に NCD 由来とみなした。XANES との対応から、このピークはヒドロキシ基の酸素 $1s \rightarrow \sigma^*$ 遷移であると帰属した。理論計算結果⁴²⁾ でも538 eV 付近にヒドロキシ基の酸素 $1s$ 由来の正の NCD ピークが 2 本予言されている。これらは実験結果の非対称な正のピーク構造とその符号も含めて非常に良い一致を示している。Phe の場合とは異なり、Ser のヒドロキシ基は不斉炭素に直接結合していない。それに関わらず同様の強度の NCD が見られていることは、カイラリティーをもつ電子準位は不斉炭素周辺のみならず分子全体に広がっていることの証左であろう。

またその近傍にも NCD らしき構造が見出せる。532 eV から535 eV にかけての複雑な構造はカルボキシ基の酸素 $1s \rightarrow \pi^*$ 遷移に帰属されるもので、理論計算⁴²⁾ でも予言されている。約548 eV のピークはカルボキシ基の酸素 $1s \rightarrow \sigma^*$ 遷移と見られるが、理論計算でも予言されていない。これらの NCD 構造はその強度が L 体、D 体で大きく異なるなど疑問点も未だ残るため、今後より詳細な再現性の測定が肝要であると思われる。

Phe および Ser とともに軟 X 線領域での NCD の信号強度は 0.1% のオーダーであった。これは Ala などのアミノ酸の真空紫外領域における NCD 測定結果³⁰⁾と比べて十分の一程度の強度である。電子遷移の終状態は真空紫外線でも軟 X 線でも同じであることを考えてみると、この強度の差は始状態である 1s 電子軌道の広がり小さいため遷移行列要素の値が小さいことに大きく起因していると考えられる。

本実験では窒素および酸素 K 殻の測定を行ったが、炭素 K 殻、特にカイラリティーの中心となっている不斉炭素の NCD 測定は非常に興味深い。しかしながら、アミノ酸は分子内に多種の炭素原子を含んでおり、理論計算⁴²⁾においても予言されているように、それらが様々な正負の NCD を有していると考えられる。このため、それらの和として観測される実際の NCD スペクトルは結果として非常に複雑なものになるか、ほとんどゼロに近いものと考えられ観測には困難が予測される。今回測定した窒素や酸素原子はアミノ酸分子内に数少ないので、比較的単純な NCD スペクトルになると予想されていた。そのため、計算との比較も容易に行うことができ、本測定の妥当性を論じることができたものと考えている。

4. まとめと展望

異方性のない蒸着膜ができたのをきっかけに、アミノ酸を対象として生体分子では初めての軟 X 線領域の NCD を測定することに成功した³⁵⁾。軟 X 線領域での NCD 研究は Ågren^ら^{42,43)}の理論計算が先行していたが実験による研究は遅れており、NCD の研究自体がはまだ始まっていなかった。この状況のなかで我々は軟 X 線領域での円二色性検出をめざして 2000 年頃から SPring-8 で研究を開始した。今回紹介したように、生体分子で軟 X 線領域の NCD の検出に成功したものの、E1M1 過程のみを考えた計算結果を実験と比較して E1E2 過程がどの程度重要かを問題提起するには我々の実験の精度もまだ不足している。軟 X 線領域の分子の NCD の発現機構は何か、平たく言えば軟 X 線領域の NCD とは何かという問題は、実験家・理論家双方にとって未解決の課題である。

軟 X 線分光は軽元素の内殻を元素選択して励起できるため、特にタンパク質、DNA、糖鎖といった生体高分子の構造情報を、原子近傍の構造に特化して得ることができ、従来の可視・紫外域の NCD よりも詳細な構造情報を得られると期待できる。また NCD は結晶化が不可能な試料でも測定可能であるから、糖鎖や膜タンパク質など今まで構造解析が困難であった生体試料にも応用可能である。NCD の測定領域を軟 X 線領域にまで拡張することによって、構造未解明の生体物質の構造を明らかにすることができる。そして、その構造解明は新規の医薬品開発等に大きな知見を与え、各種疾病の予防、治療に大きな貢献をもたら

し、その結果生じる医療分野を中心とした知的財産や疾病治療、予防による健康促進などその利益は計り知れないものと期待されている。また、軟 X 線はそのエネルギー領域が分子の化学結合エネルギーと同程度であり物質との相互作用が強いため、NCD を利用することで光学異性体を識別し光化学反応を制御できると期待されている。今回の成果は創薬や生命の起源研究に有益なヒントを与えるものである⁵⁴⁾。

本研究において我々が NCD の微弱な信号を検出できたのは、可変偏光アンジュレーターの整備と、その性能を最大限に活用するため細心の測定技術に負うところが大きかった。軟 X 線～X 線領域での NCD 測定は長い間技術的困難を極めていたが、近年、偏光制御技術は確実に進化しており、軟 X 線領域をはじめ様々なエネルギー領域での NCD の研究がより進歩することを期待している。

謝辞

本研究の実行にあたり、ビームラインの始まりを作ってくれた日本原子力研究所・横谷明徳博士に感謝いたします。本稿の測定で利用した、挿入光源、分光器、計測器の制御システムの構築は、高輝度光科学センターの松下智裕博士との協力により実現した。ここに感謝いたします。早稲田大学朝日透教授の有益な討論と助言に感謝いたします。また、挿入光源 ID23 の運用にあたり、高輝度光科学センター・田中均博士、高雄勝博士、日本原子力研究所・中谷健博士、吉越章隆博士にご尽力いただいたことに感謝いたします。NCD 実験のサポートをしていただいた日本原子力研究所・藤井健太郎博士、赤松憲博士に感謝します。最後に、この研究は中川研究室の歴代の大学院生である古結俊行氏、埴岡(児玉)洋子氏、成田悟氏、金子房恵氏、大田佳美氏、北田朋氏ならびに Jin Zhaohui 博士らとともに行ったものである。皆様の協力に感謝します。本研究は、SPring-8 共同利用 2000B0132-NS-n, 2002A0123-NS1-np, 2002B0487-NS1-np および 2003B0360-NSb-np によってなされました。

引用文献

- 1) J. B. Biot: Mem. Inst. 1, 1 (1811).
- 2) L. Pasteur: Ann. Chim. et Phys. 28, 56 (1850).
- 3) A. Cotton: C.R. Acad. Sci. (Paris) 120, 989 (1895).
- 4) N. Berova, K. Nakanishi and R. W. Woody: Circular dichroism; Principles and applications, (Wiley-VCH, New York, 2000).
- 5) 浜口浩三, 武貞啓子: 「タンパク質の旋光性」(学会出版センター, 1971).
- 6) R. W. Woody and I. Tinoco: J. Chem. Phys. 46, 4927 (1967).
- 7) J. N. Vournakis, J. F. Yang and H. A. Scheraga: Biopolymers 6, 1531 (1968).
- 8) I. Tinoco Jr., R. N. Woody and D. F. Bradley: J. Chem. Phys. 38, 1317 (1963).
- 9) D. W. Urry: Proc. N.A.S. 60, 1114 (1968).

- 10) 中川和道: 放射光 **13**, 57-61 (2000).
- 11) K. Nakagawa, T. Mochida, T. Okamoto, S. Saijoh, S. Ueji, T. Amakawa, T. Yamada, H. Onuki, in M. Akaboshi, N. Fujii and R. N. Gonzalez (editors): The role of radiation in the origin and evolution of life, Kyoto University Press, Japan, (2000) pp. 353-362.
- 12) M. Tanaka, Y. Kodama and K. Nakagawa: *Enantiomer* **7**, 185 (2002).
- 13) J. C. Sutherland, B. Lin, J. Mugavero, J. Trunk, M. Tomasz, R. Santella, L. Marry and K. J. Breslauer: *Photochem. Photobiol.* **44**, 295 (1986).
- 14) 月向邦彦, 松尾光一: 放射光 **17**, 118 (2004).
- 15) K. Gekko, R. Yonehara, Y. Sakurada and K. Matsuo: *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **144-147**, 295 (2005).
- 16) F. Pulm, J. Schramm, H. Lagier and J. Hormes: *Enantiomer* **3**, 315 (1998).
- 17) N. Ojima, K. Sakai, T. Matsui, T. Fukazawa, H. Namatame, M. Taniguchi and K. Gekko: *Chem. Lett.* **30**, 22 (2001).
- 18) A. J. Miles, F. Wien, J. G. Lees, A. Rodger, R. W. Janes and B. A. Wallace: *Spectroscopy* **17**, 653 (2003).
- 19) D. T. Clarke and G. Jones: *J. Synchrotron Rad.* **11**, 142 (2004).
- 20) B. A. Wallace, J. G. Lees, A. J. W. Orry, A. Loble and R. W. Janes: *Protein Sci.* **12**, 875 (2003).
- 21) G. R. Jones and D. T. Clarke: *Faraday Discuss.* **126**, 223 (2004).
- 22) K. Matsuo, R. Yonehara and K. Gekko: *J. Biochem.* **135**, 405 (2004).
- 23) 上工地義徳, 沖津康平, 佐藤公法, 雨宮慶幸: 放射光 **13**, 48 (2000).
- 24) M. Suzuki, N. Kawamura, M. Muzumaki, A. Urata, H. Maruyama, S. Goto and T. Ishikawa: *Jpn. J. Appl. Phys.* **37**, L1488 (1998).
- 25) M. Suzuki, N. Kawarura, M. Muzumaki, A. Urata, H. Maruyama, S. Goto and T. Ishikawa: *J. Synchrotron. Rad.* **6**, 190 (1999).
- 26) 鈴木基寛: 放射光 **13**, 12 (2000).
- 27) H. Onuki: *Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res.* **A246**, 94 (1986).
- 28) T. Yamada, K. Yagi-Watanabe, M. Tanaka, F. Kaneko, T. Kitada, Y. Ohta and K. Nakagawa: *Rev. Sci. Instrum.* *in press*.
- 29) K. Yagi-Watanabe, T. Yamada, M. Tanaka, F. Kaneko, T. Kitada, Y. Ohta and K. Nakagawa: *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **144-147**, 1015 (2005).
- 30) K. Nakagawa, M. Tanaka, F. Kaneko, T. Kitada, Y. Ohta, A. Agui, K. Fujii, A. Yokoya, K. Yagi-Watanabe and T. Yamada: *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **144-147**, 271 (2005).
- 31) L. Alagna, T. Prosperi, S. Turchini, J. Goulon, A. Rogalev, C. Goulon-Ginet, C. R. Natoli, P. D. Peacock and B. Stewart: *Phys. Rev. Lett.* **80**, 4799 (1998).
- 32) J. Goulon, C. Goulon-Ginet, A. Rogalev, V. Gotte, C. Malgrange, C. Brouder and C. R. Natoli: *J. Chem. Phys.* **108**, 6394 (1998).
- 33) J. Goulon, A. Rogalev, F. Wilhelm, N. Jaouen, C. Goulon-Ginet and C. Brouder: *J. Phys. Condens. Matter* **15**, S633 (2003).
- 34) J. Goulon, F. Sette, C. Moise, A. Fontaine, D. Perey, P. Rudolf and F. Baudelet: *Jpn. J. Appl. Phys. Part 1* **32Suppl**, 284 (1993).
- 35) M. Tanaka, K. Nakagawa, A. Agui, K. Fujii and A. Yokoya: *Physica Scripta* **T115**, 873 (2005).
- 36) T. Muro, T. Namura, T. Matsushita, H. Kimura, T. Nakatani, T. Hirono, T. Kudo, K. Kobayashi, Y. Saitoh, M. Takeuchi, T. Hara, K. Shirakawa and H. Kitamura: *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **144-147**, 1101 (2005).
- 37) 室隆桂之: 放射光 **18**, 238 (2005).
- 38) 中崎昌雄: 「旋光性理論入門」, (培風館, 1973).
- 39) L. D. Barron: *Molecular light scattering and optical activity*, (Cambridge University Press, Cambridge, 1982).
- 40) L. D. Barron and A. D. Buckingham: *Molecular Phys.* **21**, 241 (1971).
- 41) C. R. Natoli, C. Brouder, P. Saintavit, J. Goulon, C. Goulon-Ginet and A. Rogalev: *Eur. Phys. J.B.* **4**, 1 (1998).
- 42) O. Plashkevych, V. Carravetta, O. Vahtras and H. Agren: *Chem. Phys.* **232**, 49 (1998).
- 43) Li Yang, O. Plashkevych, O. Vahtras, V. Carravetta and H. Agren: *J. Synchrotron Rad.* **6**, 708 (1999).
- 44) B. L. Henke, E. M. Gullikson and J. C. Davis: *At. Data Nucl. Data Tables* **54**, 181 (1993). (http://www-cxro.lbl.gov/optical_constants/)
- 45) Y. Shindo, M. Nishio and S. Maeda: *Biopolymers* **30**, 415 (1990).
- 46) 安居院あかね, 吉越章隆, 中谷 健, 松下智裕, 齋藤祐児, 水牧仁一朗, 横谷明德, 田中 均, 宮原義一, 島田太平, 竹内政雄, 高雄 勝, 佐々木茂樹, 青柳秀樹, 工藤統吾, 佐藤一道, 呉樹奎, 大熊春夫: 放射光 **14**, 17 (2001).
- 47) A. Agui, A. Yoshigoe, T. Nakatani, T. Matsushita, Y. Saitoh, A. Yokoya, H. Tanaka, Y. Miyahara, T. Shimada, M. Takeuchi, T. Bizen, S. Sasaki, M. Takao, H. Aoyagi, T. P. Kudo, K. Satoh, S. Wu, Y. Hiramatsu and H. Ohkuma: *Rev. Sci. Instrum.* **72**, 3191 (2001).
- 48) 安居院あかね, 水牧仁一朗, 朝日 透: 放射光 **18**, 215 (2005).
- 49) T. Nakatani, A. Agui, H. Aoyagi, T. Matsushita, M. Takao, M. Takeuchi, A. Yoshigoe and H. Tanaka: *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 055105 (2005).
- 50) Y. Saitoh, T. Nakatani, T. Matsushita, A. Agui, A. Yoshigoe, Y. Teraoka and A. Yokoya: *Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res.* **A474**, 253 (2001).
- 51) J. Hasselström, O. Karis, M. Weinelt, N. Wassdahl, A. Nilsson, M. Nyberg, L. G. M. Pettersson, M. G. Samant and J. Stohr: *Surf. Sci.* **407**, 221 (1998).
- 52) M. Tanaka, K. Nakagawa, T. Koketsu, A. Agui and A. Yokoya: *J. Synchrotron Rad.* **8**, 1009-1011 (2001).
- 53) J. Stohr, J. L. Gland, W. Eberhardt, D. Outka, R. J. Madix, F. Sette, R. J. Koestner and U. Doebler: *Phys. Rev. Lett.* **51**, 2314 (1983).
- 54) 科学新聞 2005年5月20日号, (<http://www.sci-news.co.jp/news/200505/170520.htm>).

● 著者紹介 ●

中川和道

神戸大学発達科学部自然環境基礎講座

E-mail: nakagawa@kobe-u.ac.jp

専門：放射光物性，生命の起源，環境物理学

【略歴】

1978年名古屋大学大学院工学研究科博士課程（後期）修了，1980年東京大学教養学部助手，1989年神戸大学教育学部助教授，1995年神戸大学発達科学部教授，現在に至る。

田中真人

独立行政法人産業技術総合研究所計測フロンティア研究部門

E-mail: masahito-tanaka@aist.go.jp

専門：キラル光物性，磁気科学

【略歴】

2003年神戸大学大学院自然科学研究科博士（後期）課程修了，2004年早稲田大学大学院理工学研究科客員研究助手，2005年産業技術総合研究所研究員，現在に至る。

安居院あかね

独立行政法人日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門

放射光科学研究ユニット

E-mail: agui@spring8.or.jp

専門：光物性，磁気光学

【略歴】

1996年東京大学大学院工学系研究科博士課程（後期）修了，1996年日本学術振興会博士特別研究員，1997年 Uppsala 大学（スウェーデン）ビジティングリサーチャー，1999年日本原子力研究所関西研究所研究員，現在に至る。

Soft X-ray circular dichroism of biomolecules

Kazumichi NAKAGAWA Faculty of Human Development, Kobe University
Tsurukabuto, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

Makoto TANAKA Research Institute of Instrumentation Frontier, National Institute of
Advanced Industrial Science and Technology (AIST),
Tsukuba Tyuou-2, AIST, Umezono 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8568,
Japan

Akane AGUI Synchrotron Radiation Research Unit, Japan Atomic Energy Agency,
1-1-1 Kouto, Sayou-cho, Sayou-gun 679-5148, Japan

Abstract We succeeded to observe natural circular dichroism NCD for biomolecules in soft X-ray region for the first time. Evaporated films of amino acids, phenylalanine (phe) and serine (ser) were prepared in vacuum with the thickness of about 300 nm. Measurement was carried out at the soft X-ray undulator beamline BL23SU of the Spring-8, where left- and right-circularly polarized light (LCPL and RCPL) was available from an APPLE-2 undulator. Difference spectra $DA(h\nu)$ was plotted as a function of photon energy $h\nu$ of soft X-ray to be the difference between absorption coefficient A_L for LCPL and absorption coefficient A_R for RCPL, namely, $DA(h\nu) \equiv A_L(h\nu) - A_R(h\nu)$. Values of A_L and A_R were determined by means of the photoelectric drain current measurement. In the $DA(h\nu)$ spectra for L-phe films, negative peak was observed at 407 eV. On the contrary, for D-phe films, positive peak was observed at 407 eV with the same magnitude but opposite sign. Moreover, no signal was observed for racemic phenylalanine (DL-phe). In the wavelength region of visible to ultraviolet, there is well-known general law in which NCD signals for D- and L-enantiomers are the same magnitude but opposite sign and racemic compound does not show NCD spectra. Characteristic features in $DA(h\nu)$ spectra of the L-phe, D-phe and DL-phe were of good agreement with this well-known general law. Based on this good agreement, we concluded that peaks at 407 eV in the $DA(h\nu)$ spectra are true NCD peaks. For ser films, we assigned peaks at 540 eV and 548 eV to be NCD peaks in the same manner. We hope that our first observation of NCD for biomolecules at soft X-ray region will open new science and technologies such as basic science including elucidation of fundamental mechanism of NCD and application to manipulate biomolecules using circularly polarized soft X-ray beams.