

キャップチロシンの励起状態ダイナミクスの コンフォメーション依存性

石内俊一, 孫雲龍, 藤井正明

東工大・資源研

生体関連分子の電子励起状態の緩和過程は、バルクと生体環境中では大きく異なる場合がある。例えば、緑色蛍光タンパク質のチロシン由来の発色団は、タンパク質中では緑色の蛍光を発するのに対して、水溶液中ではほとんど発光しない。これは、タンパク質中では発色団が水溶液中とは異なるコンフォメーションを取り、速い無輻射過程が抑制されるためであると考えられている[1]。また、核酸塩基対の電子励起状態緩和も分子間水素結合構造に強く依存する事が気相分光により明らかになっている。気相中では、天然型である Watson-Crick (W-C) 構造では速い緩和過程を反映してブロードな電子スペクトルが観測されるのに対して、非 W-C 構造ではシャープな電子スペクトルが観測される。この速い緩和過程は、 $\pi\pi^*$ 状態から、N 原子の lone pair が関与する $n\pi^*$ 状態を経由して、効率的に基底状態に内部転換するメカニズムで説明されており、電子励起エネルギーを速やかに熱エネルギーに変換していると考えられる[2]。天然型でのみ速い緩和過程が存在するという事実は大変興味深く、実際に DNA の光化学反応の量子収率は著しく小さい事を勘案すると、生物はこの速い緩和過程を DNA の光防御機構として利用している様に見える。

この様に、生物は分子のコンフォメーションを制御する事により、励起状態緩和を巧妙にコントロールしている。光防御の点では、DNA 以外にも、近紫外域に吸収をもつ分子はコンフォメーションの制御による光防御機構をもっている可能性がある。タンパク質を構成するアミノ酸には紫外域に強い吸収をもつ3つの芳香族性アミノ酸 (Phe: フェニルアラニン、Tyr: チロシン、Trp: トリプトファン) があり、これらを含むペプチドの構造と励起状態ダイナミクスの相関に興味を持たれる。Jouvet らは Phe を含むペプチドのモデル分子としてキャップフェニルアラニン (Ac-Phe-NH₂) に対し超音速ジェット分光を適用し、コンフォマーの構造とそれらの励起状態寿命を測定した。その結果、C7 構造 (図1) が他の構造に比べて1桁程度単寿命であることを見いだした[3]。Domcke らは理論計算により、C7 構造における電荷移動状態でのプロトン移動反応が S₁ 状態から S₀ 状態への無輻射緩和を加速するという説を唱えている[4]。C7 構造における速い緩和過程はキャップトリプトファン (Ac-Trp-NHCH₃) でも示唆されており[5]、C7 構造が一般的に速い緩和過程を誘起する可能性がある。残るキャップチロシンについては報告例がなく、構造と励起状態緩和過程の相関に興味を持たれる。そこで、本研究ではキャップチロシン (Ac-Tyr-NHCH₃) にレーザー脱離超音速ジェット法を適用し、コンフォマー毎の電子スペクトル及び赤外スペクトルを測定し、構造と励起状態緩和過程の相関を明らかにすることを目的とした。

図2に Ac-Tyr-NHCH₃ の共鳴多光子イオン化 (REMPI) スペクトル及び UV-UV ホールバーニング (HB) スペクトルを示す。REMPI スペクトルにはシャープなバンドとブロードな吸収が観

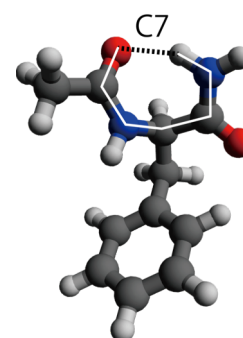


図1 Ac-Phe-NH₂ の C7 構造
N-H...O=C 水素結合が 7 員環を巻いている。

測された。異なる5本のHBスペクトルが観測されたことから、REMPI スペクトルには少なくとも5つのコンフォーマーが寄与していることが分かった。5つのコンフォーマーの内、コンフォーマーA, Bがブロードな電子遷移を与えており、速い電子励起状態緩和過程を有する可能性が示唆された。

そこで、これらの構造を明らかにするため、IR dip 分光法を用いて各コンフォーマーの赤外スペクトルを測定し、量子化学計算の結果と比較した。その結果、コンフォーマーA, BはC5構造に、コンフォーマーD, EはC7構造に帰属された。他のアミノ酸と同様にC7コンフォーマーで速い緩和過程が存在するとすれば、ブロードな電子遷移を与えるコンフォーマーA, BがC7構造となるはずであるが、本研究の結果はそのような予想とは相反する。

電子遷移のブロードニングは必ずしも速い緩和だけで起こるものではなく、電子遷移に伴う大きな構造変化による多数の振電バンドの出現の可能性もある。従って、励起状態寿命を明確に議論するためにはポンプ-プローブ法による寿命測定が必要である。ナノ秒レーザーによるポンプ-プローブ実験を行ったところ、いずれのコンフォーマーでも時間プロファイルは装置関数に一致しており、励起状態寿命はサブナノ秒以下であることが分かった。今後はピコ秒レーザーシステムを用いて寿命を測定し、コンフォメーションと励起状態寿命の相関を明らかにする予定である。

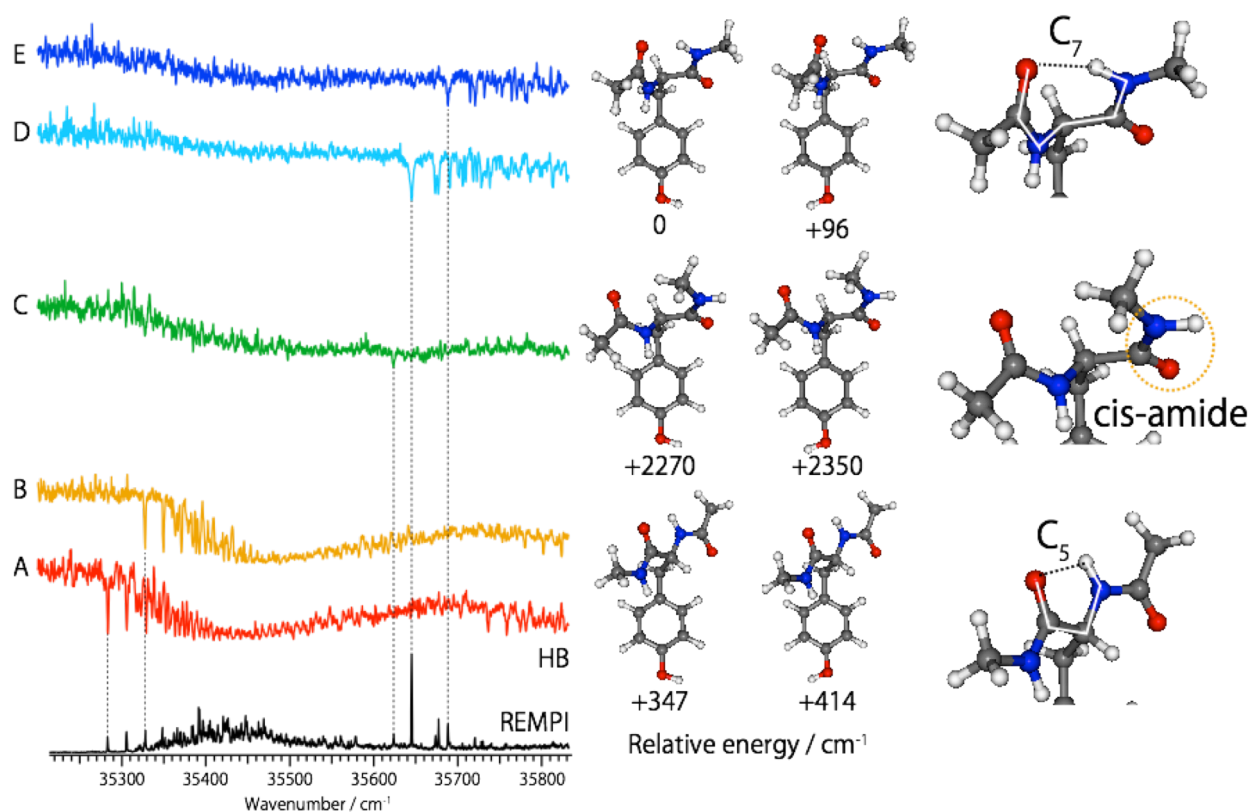


図2 Ac-Tyr-NHCH₃ のREMPI及びHBスペクトルと構造帰属

【参考文献】 [1] H. Niwa, et al., *PNAS*, **1996**, *93*, 13617. [2] A. Abo-Riziq, et al., *PNAS*, **2005**, *102*, 20. [3] M. Malis, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 20340. [4] W. Domcke and A. L. Sobolewski, *Nat. Chem.*, **2013**, *5*, 257. [5] B. C. Dian, et al., *J. Chem. Phys.*, **2002**, *117*, 10688.

ドーパミン及び関連分子の気相分光

石内俊一, 孫雲龍, 藁科太一, 藤井正明

東工大・資源研

神経伝達では、神経伝達物質が特定の受容体と結合し、シグナルが伝達される。この過程はしばしば鍵と鍵穴に例えられる。神経伝達物質は複数の単結合を持ち、多数のコンフォメーションをとり得る柔らかい分子であり、そのような分子がどうやって鍵としての機能を発揮しているのか分子科学的にも興味深い。このような柔らかい分子による分子認識機構を理解するためには、それぞれの分子がどのようなコンフォメーションを取り得るのか明らかにする必要がある。しかし常温溶液中では種々のコンフォマー間を揺らいでいるため、精密な構造解析は困難である。超音速ジェット法を用いると、極低温孤立状態を実現でき構造揺らぎを止めることができる。その結果種々のコンフォマーを異性体として分離観測できる。これまで我々は代表的な神経伝達物質であるカテコールアミンとその関連分子にこの方法を適用し、それらのコンフォマー数を明らかにしてきた[1-5]。その結果、コンフォマー数には規則性があることが明らかになってきた(表1)。カテコール環からOH基を2つとも外したものの、1つだけ外したもの(アミン鎖に対してp-位にOH基を有するものとm-位に有するものの2種類)では、コンフォマー数が2倍ずつ増えていく。この2倍規則はアミン鎖のコンフォメーションとそれに対するフェノールOH基の配向を独立に考えることで容易に説明できる。ただし、m-チロシン及びチラミンでは一見この規則から外れているように見えるが、前者ではコンフォマー数が多くて全てを測定できていない、後者では1つのコンフォマーにおいてアミン鎖が鏡映対称性を持つためOH配向の異なる2つのコンフォメーションが光学異性体の関係になり本研究においては区別できない、ということで説明できる。この2倍規則をカテコールアミンに適用すると、コンフォマー数はm-置換体と同数になるはずであるが、実際にはそれより圧倒的に少ない。これらの規則性が一般的なものか確定するには表1を完成させる必要があるが、m-チラミンとドーパミンが未測定である。それはこれらの分子が酸化され易く入手困難だからである。本研究では酸化されない原料からm-チラミン、ドーパミンを脱酸素条件下で生成する方法を開発することで、それぞれの分子のコンフォメーションを区別した電子スペクトルを測定し、それぞれのコンフォマー数を決定することを目的とした。

まず、m-チラミンを測定するためにアミノ酸の熱分解を利用することを着想した。出発物質としてm-チロシンを使用し、アルゴンガスに満たされたサンプルホルダー内で加熱・脱炭酸を行うことでm-チラミン蒸気をアルゴン雰囲気下で得た。これをそのまま真空

表1 カテコールアミンと関連分子のコンフォマー数

chromophore	amino acid	ethyl amine	ethanol amine	Ethanol methyl amine
Benzene	Phenylalanine 6	Phenylethylamine 4	APE 2	MAPE 3
p-Phenol	Tyrosine 12	Tyramine 7	Octopamine 4	Synephrine 6
m-Phenol	m-Tyrosine >14	m-Tyramine	m-Octopamine 8	Phenylephrine 12
catechol	Dopa 1	Dopamine	Noradrenaline 3	Adrenaline 4

中にジェット噴射することで m-チラミンの超音速ジェットを得た。ドーパミンは塩酸塩としては安定に存在する。オクトパミン及び m-オクトパミンの研究で、これらの塩酸塩を直接レーザー脱離すると脱塩酸も同時に起こることを見いだしており[4]、この方法を塩酸ドーパミンに適用することで純粋なドーパミンを得ることに成功した。これらの方法で各分子の超音速ジェットを得て、共鳴多光子イオン化 (REMPI) および UV-UV ホールバーニング (HB) 分光法を用いることで、m-チラミンおよびドーパミンのコンフォーマーを区別した電子スペクトルを測定し、コンフォーマー数を決定した。

図1に m-チラミンの REMPI 及び HB スペクトルを示す。REMPI スペクトルに観測されたバンドを丹念にプローブして HB スペクトルを測定したところ a-n の合計 14 本の異なるスペクトルが得られた。従って、m-チラミンは 14 個の異なるコンフォーマーを持つことが判明した。チラミンのコンフォーマー数は 7 なので、この結果は 2 倍規則に従う。

一方、ドーパミンの REMPI 及び HB スペクトルを測定したところ、異なる 5 本の HB スペクトルが観測された。赤外スペクトルの解析により HB スペク

トル e は塩酸ドーパミンに由来することが判明し、コンフォーマー数は 4 と決定された。他のカテコールアミン同様 2 倍規則から予測されるコンフォーマー数より遥かに少ないことが分かった。

以上より、表1が完成し、1) カテコールアミン以外では 2 倍規則が成立し、2) 一方でカテコールアミンは 2 倍規則から予想されるコンフォーマー数に比べてコンフォーマー数は圧倒的に少ないことが明らかになった。

【参考文献】 [1] K. Makara, et al., *J. Phys. Chem. A*, **2008**, *112*, 13463. [2] H. Mitsuda, et al., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, *1*, 1130. [3] S. Ishiuchi, et al., *PCCP*, **2011**, *13*, 7812. [4] S. Ishiuchi, et al., *Chem. Lett.*, **2013**, *42*, 1166. [5] Y. Shimozono, et al., *PCCP*, **2013**, *15*, 5163.

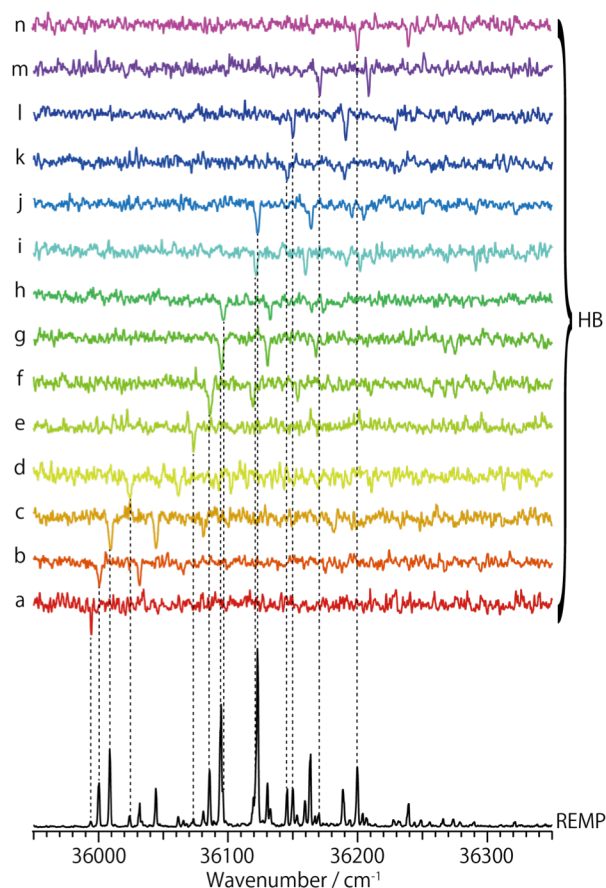


図1 m-チラミンの REMPI 及び HB スペクトル

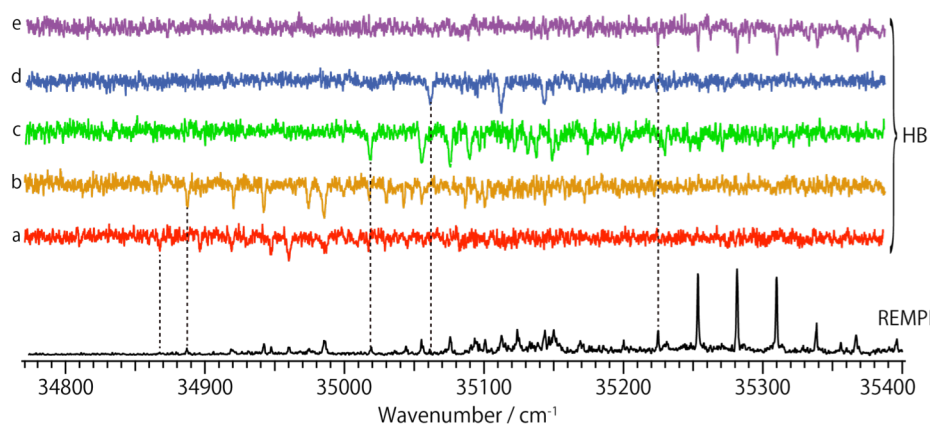


図2 ドーパミンの REMPI 及び HB スペクトル

Laser desorption supersonic jet spectroscopy of octopamine and *m*-octopamine hydrochlorides

Shun-ichi Ishiuchi and Masaaki Fujii

Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology

Catecholamines are one of the typical neurotransmitters and their conformations have been investigated by using gas phase spectroscopic techniques from a curiosity about the molecular recognition between the neurotransmitters and their receptors. Figure 1 shows structural formulae of catecholamines and their relevant molecules. We applied laser desorption supersonic jet spectroscopy to dopa, which is a precursor of dopamine and a tyrosine derivative having two neighboring phenolic OHs, i.e., catecholic OHs. As a result, it was found that dopa has a single conformation in gas phase.[1, 2] This result is quite surprising because tyrosine has 12 conformers.[3] Difference between dopa and tyrosine is that the former has a phenolic OH at meta-position with respect to the alkyl amine (amino-acid) chain while the latter does not. Thus the small number of conformers in dopa may be explained by some interaction between the *m*-OH group and the amino-acid chain. If the *m*-OH group contributes to the reduction of dopa's conformation, the small number of conformers should be observed also in *m*-tyrosine which is an isomer of tyrosine and has a phenolic OH at meta-position. However, at least 14 conformers are observed in *m*-tyrosine.[1] This result clearly demonstrates that the conformational reduction occurs only when two neighboring phenolic OH groups exist in spite of no direct interaction, such as intra molecular hydrogen bond, between the phenolic OH and the amino-acid chain.

Such tendency, i.e., *p*-phenolamine has multi conformations, *m*-phenolamine has more and catecholamine has quite few, can be seen also in adrenaline and its derivatives. Numbers of conformers of synephrine, phenylephrine and adrenaline are 6, 12 and 4, respectively.[4] The numbers of conformers of synephrine and phenylephrine can be rationalized by considering the conformations of the alkyl amine chain and orientations and substitution positions of the phenolic OH. In 2-methylamino-1-phenylethanol (MAPE), which has the same alkyl amine chain as adrenaline and no phenolic OH, 3 conformations are observed in gas phase.[5] This means that the alkyl amine chain of adrenaline can adopt 3 conformations. By substituting the para-position of MAPE by a phenolic OH, which corresponds to synephrine, twice number of conformers can be expected because of 2 orientations of phenolic OH with respect to each conformation of the alkyl amine chain. In addition, by relocating the *p*-OH to meta-position, which corresponds to phenylephrine, the number of conformers should double because there are two choices to relocate the phenolic OH, left-side or right-side.

Also in noradrenaline, the number of conformers is quite few, actually 3 conformers are observed.

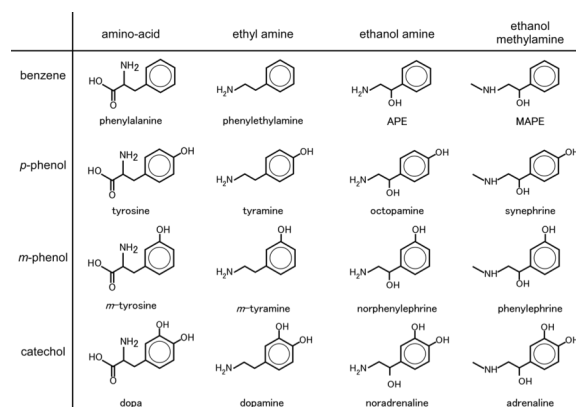


Fig. 1 Structural formula of catecholamines and their relevant molecules

However, numbers of conformers of its relevant molecules except no phenolic OH analog, 2-amino-1-phenyl-ethanol (APE), have not been reported yet. The number of conformers of APE has been reported to be 2,[6] so if the same conformational evolution pattern as the adrenaline analogs can be adapted, 4 and 8 conformers should be observed in octopamine and *m*-octopamine which correspond to *p*- and *m*-phenolamine, respectively. The reason why these molecules have not been measured may be due to their chemical instability. Actually, these amines are easily oxidized with air. To avoid the oxidization, these molecules are commercially available as hydrochloride salts. The hydrochloride can be eliminated by chemical preparations, however, the deacidification and subsequent preparations should be performed under anoxic conditions.

Recently, however, we found that such chemically fragile molecules can be laser-desorbed even if the hydrochloride is not eliminated, i.e., if hydrochloride salts are prepared for the laser desorption target without any chemical preparations, mass peak of molecular ion without hydrochloride can be observed.[7] Thus troublesome chemical processing is not necessary to prepare the laser desorption target.

Figure 2 and 3 show resonance enhanced multiphoton ionization (REMPI) and UV-UV hole burning (HB) spectra of octopamine and *m*-octopamine which were vaporized by laser desorption of their hydrochlorides. In each spectrum, the burn laser was fixed to each alphabetized bands of REMPI spectrum. In octopamine, 4 different HB spectra were observed, while 8 in *m*-octopamine, which means that 4 and 8 conformers coexist in each molecule. This result coincides with our prediction mentioned above. Namely, the propensity doubling rule was confirmed also in the series of APE, octopamine and *m*-octopamine. If this rule is applied to noradrenaline, the

same number of conformers as *m*-octopamine, i.e. 8, should be observed in noradrenaline. However, only 3 conformers are observed in noradrenaline, which is still much less than 8. Thus, also in noradrenaline, it is true that the small number of conformers coexist in the catecholamines.

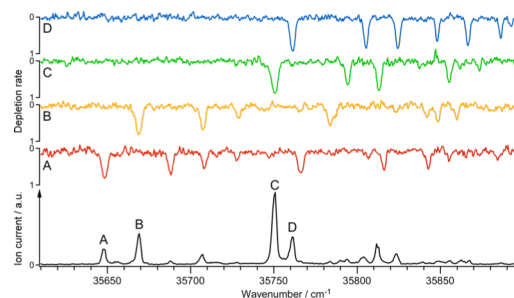


Fig. 2 REMPI (bottom) and HB (upper) spectra of octopamine

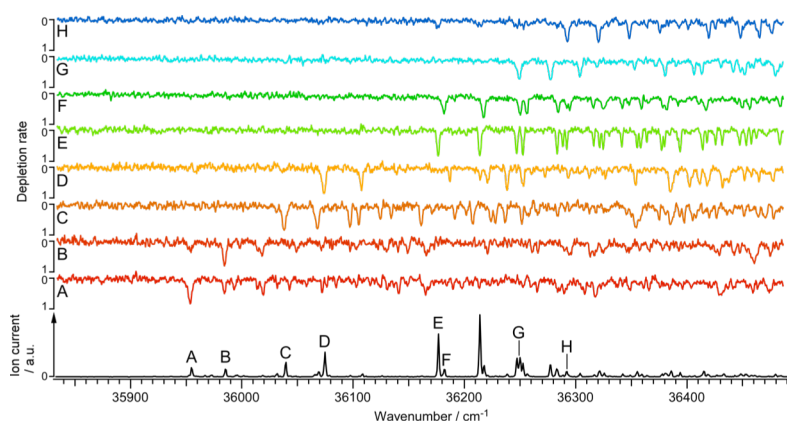


Fig. 3 REMPI (bottom) and HB (upper) spectra of *m*-octopamine

【References】 [1] H. Mitsuda, et al., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, *1*, 1130. [2] S. Ishiuchi, et al., *PCCP*, **2011**, *13*, 7812. [3] Y. Shimozono, et al., *PCCP*, **2013**, *15*, 5163. [4] S. Ishiuchi, et al., *J. Phys. Chem. A*, **2011**, *115*, 10363. [5] P. Butz, et al., *J. Phys. Chem. A*, **2001**, *105*, 1050. [6] R. J. Graham, et al., *J. Phys. Chem. A*, **1999**, *103*, 9706. [7] S. Ishiuchi, et al., *Chem. Lett.*, **2013**, *42*, 1166.