

東京工業大学グループ
(グループリーダー：藤井 正明)

アドレナリン受容体部分ペプチドの 末端修飾によるコンフォメーション制御

石内俊一, 大場妃香里, 藤井正明

東工大・資源研

神経伝達物質と受容体タンパク質は「鍵と鍵穴」の関係に例えられ、受容体は特定の神経伝達物質を認識し結合して細胞内へシグナルを伝達する。この分子認識機構を分子レベルで理解するために、神経伝達物質と受容体の結合構造の解明は極めて重要である。アドレナリン受容体タンパクはGタンパク質共役受容体と呼ばれる膜タンパクの一つで、アミノ酸 413 残基からなる巨大分子であるが、神経伝達物質との相互作用はその局所的な部分で起こることが知られている。生化学的手法により、アドレナリン受容体では細胞膜内の α -ヘリックス鎖に存在する 2 つの Ser がリガンド結合部位であることが示唆されており [1]、これら Ser 側鎖の OH 基がカテコール OH 基と水素結合を形成すると考えられている [2]。そこで、この分子認識部位を含むアドレナリン受容体の部分配列である 5 残基ペプチド (Ser-Ile-Val-Ser-Phe-NH₂: SIVSF-NH₂) の構造を気相分光の手法を適用して調べた。ところが、受容体部分ペプチドの末端構造として NH₂ 基を選択したため、本来、相互作用しないはずの末端の NH₂ 基が Ser 側鎖の OH 基と水素結合を形成し、細胞膜内でアドレナリン受容体が形成しているはずの α -ヘリックス鎖に由来する構造が全く見いだされなかった。そこで本研究では、N 末端をアセチル化、C 末端をメチルアミド化により保護したペプチド Ac-SIVSF-NHMe (図 1) を取り上げ、末端修飾による主鎖構造への影響を調べた。Ac-SIVSF-NHMe に対し、レーザー脱離超音速ジェット分光法を適用し、共鳴多光子イオン化 (REMPI) スペクトル、IR dip スペクトルを測定した。

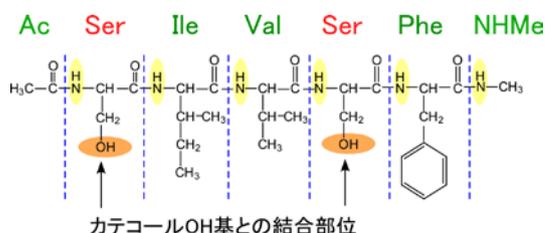


図 1 Ac-SIVSF-NHMe

Methylamide Sieber レジンをを用いた固相合成法により Ac-SIVSF-NHMe を合成した。これを凍結乾燥した後、カーボンブラックと混合してグラファイト製ディスクに塗布した。ここに脱離レーザー (1064 nm) を照射して脱離・気化させた。これを Ar ガス (よどみ圧: 80 bar) のパルスジェットで押し流し、スキマーで分子線に切り出した。波長可変紫外レーザーを照射して生成したイオンを飛行時間型質量分析器で検出した。Ac-SIVSF-NHMe の質量をモニターしながら紫外レーザーを波長掃引し、電子スペクトルに相当する REMPI スペクトルを得た。次に、REMPI スペクトルに観測された特定のバンドに紫外レーザー ν_{UV} を固定し、生成するイオン量をモニターしながら、波長可変赤外レーザー ν_{IR} を照射し波長掃引した (図 2)。このとき生成するイオン量は特定のコンフォマーの基底状態の分子数に比例する。 ν_{IR} が特定のコンフォマーの振動遷移エネルギーに一致すると、赤外励起によって基底状態の分子数が減少するため、モニターしているイオン量が減少する。したがって、 ν_{UV} で選択した特定のコンフォマーの赤外スペクトルをイオン量の減少として測定できる (IR dip 分光法)。

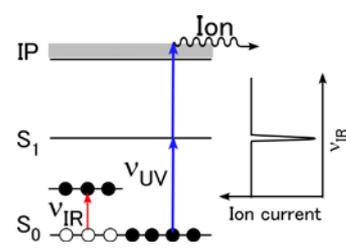


図 2 IR dip 分光法の原理

このとき生成するイオン量は特定のコンフォマーの基底状態の分子数に比例する。 ν_{IR} が特定のコンフォマーの振動遷移エネルギーに一致すると、赤外励起によって基底状態の分子数が減少するため、モニターしているイオン量が減少する。したがって、 ν_{UV} で選択した特定のコンフォマーの赤外スペクトルをイオン量の減少として測定できる (IR dip 分光法)。

図3に Ac-SIVSF-NHMe の REMPI スペクトルを示す。37536 cm^{-1} から高波数側 530 cm^{-1} の範囲に複数のバンドが観測された。REMPI スペクトル中のバンド a~c に ν_{NH} を固定して IR dip スペクトルを測定したところ、バンド a、c に固定した場合とバンド b に固定した場合には異なる赤外スペクトルが得られ (図4 a, b)、2つの異なるコンフォーマー a, b が共存している事が分かった。今回の結果を SIVSF-NH₂ の赤外スペクトル (図4 c) と比較したところ、大きく異なっており、末端修飾によりペプチド構造が大きく変化したことが示唆された。

Ac-SIVSF-NHMe の2つのコンフォーマーを比較するとコンフォーマー b では 3400-3470 cm^{-1} に複数のバンドが観測された。一方、コンフォーマー a ではこの領域にバンドは見られず、3372 cm^{-1} より低波数側にレッドシフトした NH 伸縮振動が観測された。これよりコンフォーマー a はコンフォーマー b よりも強固な水素結合を形成していることが示唆される。コンフォーマー b の 3472 cm^{-1} 付近のバンドは、振動数に基づき自由な NH 伸縮振動と帰属した。また、3401 cm^{-1} 及び 3435 cm^{-1} のバンドは、これまでの研究結果より [3]、C₁₀ 構造 (数字は NH...O=C 間の水素結合により形成されるサイクル (cycle) の原子数を示す[4]) の水素結合を形成した NH 伸縮振動と暫定的に帰属した。一方、コンフォーマー a ではコンフォーマー b と異なり、3344 cm^{-1} 付近にブロードなバンドが観測された。このバンドは、C₁₃ 構造 (α -ヘリックスに相当) の NH 伸縮振動が 3320-3350 cm^{-1} に現れることより [3]、 α -ヘリックスに由来する α -ターン構造の水素結合を形成した NH 伸縮振動と帰属した。SIVSF-NH₂ では α -ターン構造が観測されなかったが、この結果はペプチド末端の保護によりコンフォメーションが本来の α -ヘリックス構造に近づいた事を示している。詳細な構造を明らかにするため、分子動力学シミュレーション及び量子化学計算により構造の探索と理論赤外スペクトルの計算を理化学研究所杉田グループと共同で進めている。

【参考文献】 [1] A. D. Strosberg, Protein Science, **2**, 1198 (1993). [2] J. Ostrowski, Annu Rev Pharmacol Toxicol, **32**, 167 (1992). [3] J. A. Stearns et al., Phys. Chem. Chem. Phys., **11**, 125, (2009). [4] Wutharath Chin et al., Phys. Chem. Chem. Phys., **8**, 1033, (2006).

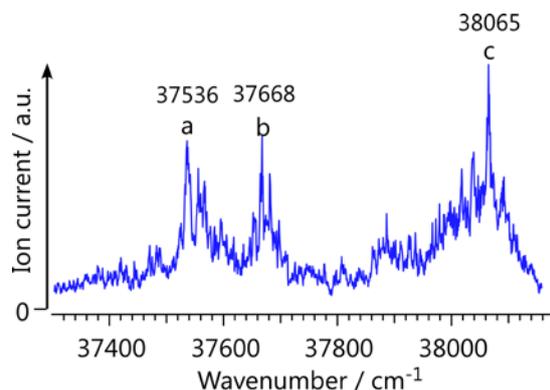


図3 Ac-SIVSF-NHMe の REMPI スペクトル

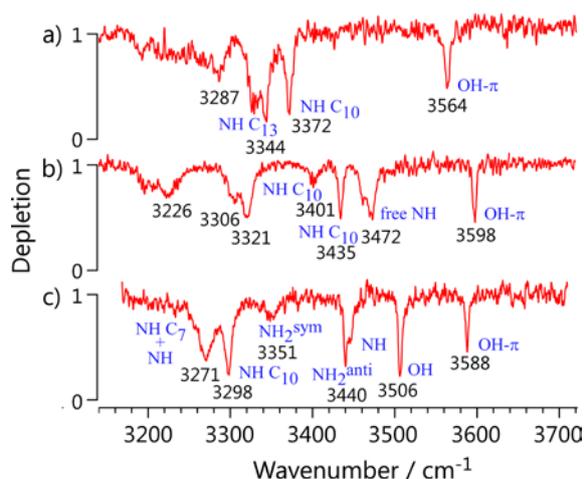


図4 Ac-SIVSF-NHMe (a, b)及び SIVSF-NH₂ (c)の IR dip スペクトル

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, 篠原潤平, 藁科太一, 孫雲龍, 藤井正明

東工大・資源研

生体関連分子の様なフレキシブルな分子、すなわち複数のコンフォメーションをとり得る分子ではコンフォメーションによって異なる励起状態ダイナミクスを有することがしばしばある。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 [1]。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 [2]。C7 構造における速い緩和過程はキャプトリプトファン (Ac-Trp-NHCH₃) でも示唆されており [3]、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

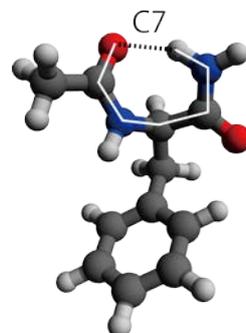


図 1 Ac-Phe-NH₂ の C7 構造
N-H...O=C 水素結合が 7 員環を巻いている。

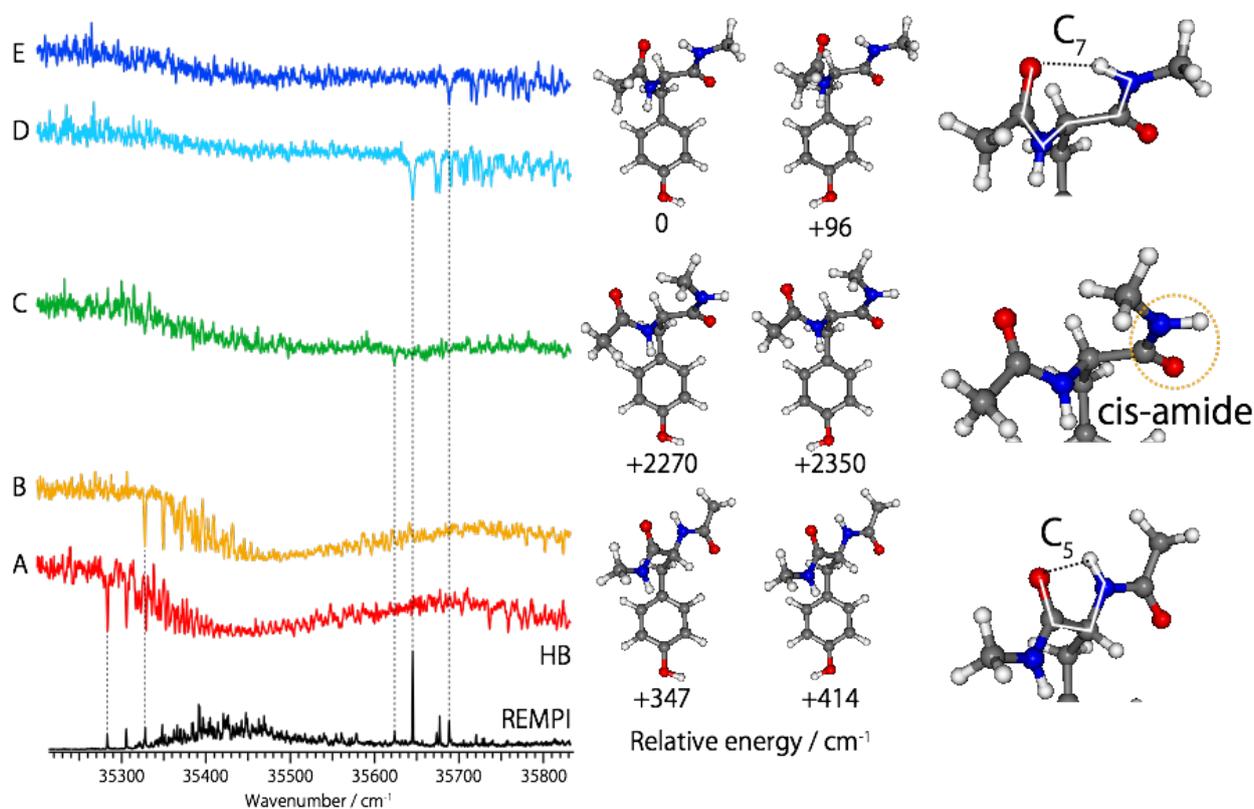


図 2 Ac-Tyr-NHCH₃ の REMPI 及び HB スペクトルと構造帰属

フォー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。

昨年、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) スペクトルを測定し、5つのコンフォーマー (A~E) が共存することを見出した。その内2つのコンフォーマー (A, B) の電子スペクトルにはブロードな吸収が観測され、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。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、この結果はそのような予想とは相反している。

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。2台の紫外ピコ秒レーザーを用いて寿命測定した結果を図3に示す。1台目の紫外レーザーをREMPIスペクトルに観測された各コンフォーマーのバンドに合わせ(Cは信号強度が弱く測定できなかった)、それ

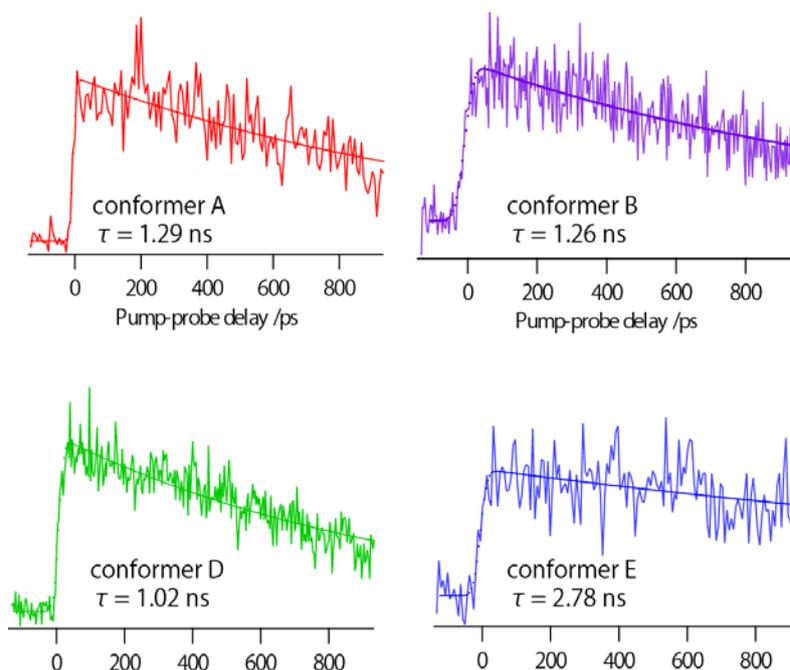


図3 ポンプ-プローブ法によるコンフォーマーごとのS₁寿命測定

ぞれをS₁状態に励起し、遅延時間(図3横軸)の後に2台目の紫外レーザー(280 nm)でイオン化した。結果としてはコンフォーマーの違いによる寿命の有意な差は観測されず、いずれのコンフォーマーでもおよそ1 nsであった。このことから、コンフォーマーA, Bで観測されたブロードな電子遷移は短い寿命を反映したものではなく、バンドのたて混みによるものであることが示唆された。ここで、興味深いのはフェニルアラニンで観測された励起状態寿命のコンフォーマー依存性が、なぜチロシンでは観測されないかということである。フェノールのS₁の寿命は2 nsほどであり[4]、今回観測された寿命とほぼ同じである。一方、フェニルアラニンの場合は励起状態緩和が加速されたとしても最も寿命が短いもので1.5 nsほどである[1]。従って、ペプチド鎖のコンフォーマーシヨンの違いが異なる緩和過程を誘起する可能性はあったとしても、フェノール発色団が本来持っている励起状態緩和過程の方が速いため、コンフォーマーシヨンの違いによる差が観測されなかったものと考えられる。

【参考文献】 [1] M. Malis, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 20340. [2] W. Domecke and A. L. Sobolewski, *Nat. Chem.*, **2013**, *5*, 257. [3] B. C. Dian, et al., *J. Chem. Phys.*, **2002**, *117*, 10688. [4] R. J. Lipert, et al., *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 380.

エレクトロスプレー・冷却イオントラップ法による プロトン付加カテコールアミンの紫外光解離分光

石内俊一, 加藤大智, 大場妃香里, 藤井正明

東工大・資源研

ドーパ及びドーパミンはカテコールアミン神経伝達物質の1つであり、2個のフェノール OH 基とアミノ酸鎖、エチルアミン鎖を1,2,4-位にもつベンゼン置換体である。我々はこれらの中性状態に関してはレーザー脱離・超音速ジェット法によりコンフォマーの個数やそれぞれの構造について既に研究しており、観測されるコンフォマーが特異的に少ない事を見出している[1]。アミンは生体内ではほとんどプロトン化していると考えられているため、これらのプロトン付加体の研究は不可欠である。プロトン付加ドーパミンの気相中での赤外多光子解離 (IRMPD) スペクトルは既に Dopfer らによって報告されているが[2]、室温での測定でありコンフォマーを選別していないので、構造の帰属にはかなりの任意性がある。これらの構造を正確に帰属するためには、冷却イオントラップを用いた IR-UV 2重共鳴分光が不可欠である。本研究ではまずその第一歩として、紫外光解離分光法により冷却イオントラップ中のプロトン化ドーパ及びドーパミンの電子スペクトルを測定する事を目的とした。

プロトン付加体でもう一つ興味深いのはその励起状態ダイナミクスである。トリプトファンではプロトン化により励起状態ダイナミクスが大きく変化する事が知られている[3]。本研究で取り上げるドーパ及びドーパミンはカテコールが発色団であるが、カテコール自体の S_1 状態の寿命は 7 ps と短かく (電子遷移はシャープであるが)、速い無輻射緩和過程の存在が示唆されている。また、これはカテコール OH 基の面外変角と強く相関しており、O-H 結合の反結合性軌道が関与する $\pi\sigma^*$ 状態への内部転換が速い無輻射緩和の原因であると考えられている[4]。カテコールアミンの場合、プロトン化はアミノ基で起こると考えられるが、電荷の存在がカテコール OH 基の配向に影響を及ぼしたり、あるいはプロトン化アミノ基が直接ベンゼン環に相互作用するなどして、励起状態ダイナミクスが中性状態とは大きく異なる可能性があり、その点を明らかにすることも本研究の目的である。

図1に本研究で用いたエレクトロスプレー (ESI) ・冷却イオントラップ装置の模式図を示す。水・メタノール1:1混合溶媒に試料を溶かし酢酸を1滴加えた溶液をシリンジポンプで高電圧を印加したキャピラリーに送液し、エレクトロスプレーを得た。これを加熱キャピラリーに通すことで脱溶媒させ、オクタポールイオンガイドを用いて高真空中に導入した。イオンはパルス電圧

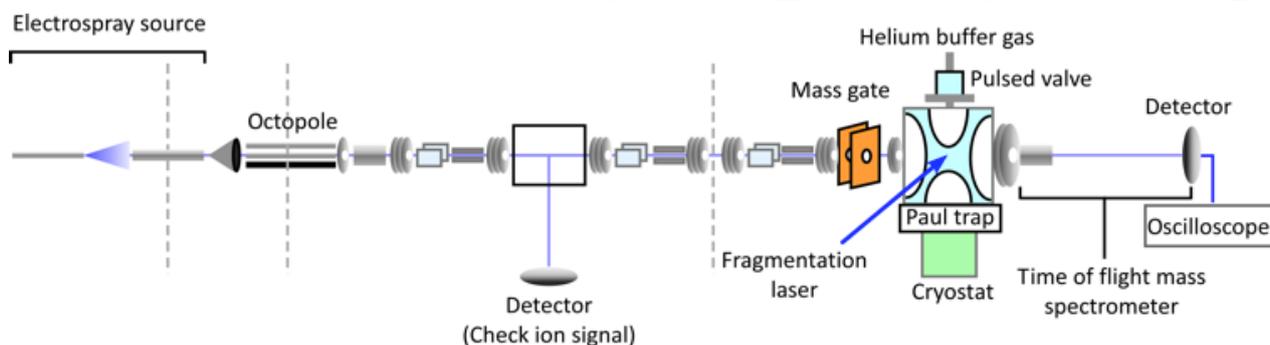


図1 ESI・冷却イオントラップ装置

を印加したイオンレンズによりバンチングされ、マスゲートにより特定の飛行時間、すなわち質量のイオンのみを選択して、クライオスタットで数Kに冷却した四重極イオントラップに導入した。ここにはイオン導入の前にはあらかじめパルスバルブを通じてHeガスを導入し、冷えたHeガスで満たしておく。イオンは冷えたHeガスと衝突することで冷却される。ここに波長可変紫外レーザーを導入し、波長掃引する。紫外レーザーが電子遷移に共鳴しイオンが電子励起されると、前期解離によりフラグメントが生成する。これを後段の飛行時間型質量分析器で検出することにより、電子遷移をフラグメント量の増加として測定することができる。

図2にプロトン付加ドーパ及びドーパミンの紫外光解離スペクトルを示す。比較のためにプロトン付加チロシンの紫外光解離スペクトルも併せて示す。ドーパ及びチロシンはCOOH+H lossチャンネルを、ドーパミンはNH₃ lossチャンネルをモニターした。チロシンでは過去に報告されている様にシャープな構造が観測されたのに対して[5]、ドーパ、ドーパミンではプログレッションらしき構造は観測されるものの、シャープな振電バンドは観測されず、ブロードなスペクトルが観測された。冒頭で述べた様に、トリプトファンはプロトン付加によりS₁状態の寿命が劇的に短くなり、380 fsと報告されている[6]。このとき、紫外光解離スペクトルにはプロトン付加ドーパやドーパミンで観測される様なプログレッション構造は見られず、非常にブロードなものとなる[3]。一方、シャープな構造が観測されるプロトン付加チロシンの寿命は22.3 psと報告されている[6]。従って、プロトン付加ドーパ及びドーパミンのS₁状態の寿命はサブピコ秒~ピコ秒一桁台であると予想される。

上述のように中性のカテコールもS₁状態の寿命は短く、S₂状態であるπσ*状態がS₁(ππ*)に接近してくることが原因であると考えられている[4]。プロトン付加体でも同様のことが起こるかを量子化学計算で調べたところ(RI-CC2/aug-cc-pVDZ)、ドーパミンではS₁-S₂のS₀最安定構造におけるエネルギー差は0.15 eVであるのに対して、ドーパミンよりフェノールOH基を1個及び2個少ないチラミン、フェニルエチルアミンでは0.37, 0.70 eVとなり、カテコールアミンの短寿命化はπσ*状態の安定化が原因であることが示唆された。

【参考文献】 [1] H. Mitsuda, et al., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 1130., S. Ishiuchi, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13, 7812. [2] A. Lagutschenkov, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13, 2815. [3] S. R. Mercier, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 16938. [4] M. Weiler, et al., *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, 4, 3819. [5] O. V. Boyarkin, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 2816. [6] H. Kang, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2005**, 7, 394.

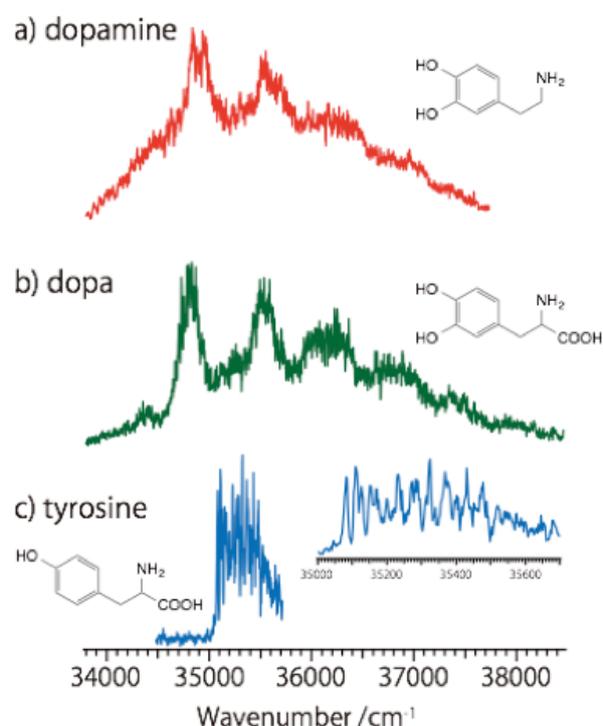


図2 プロトン付加ドーパミン(a), ドーパ(b)及びチロシン(c)の紫外光解離スペクトル
c)のインセットはチロシンのスペクトルの横軸を拡大したもの。