

東京工業大学グループ
(グループリーダー：藤井 正明)

エレクトロスプレー・冷却イオントラップを用いた

新規光解離分光装置の開発

石内俊一，輪胡宏学，加藤大智，藤井正明

東工大・資源研

1980 年半ばに発明されたエレクトロスプレーイオン化(ESI)法[1]により、試料分子を分解することなくイオン化して気相中に取り出すことが可能となり、生体分子の質量分析が急速に拡大した。今日では、生化学研究や材料開発において質量分析は最も強力なツールの 1 つとなっている。しかし、質量分析から分かることは言うまでもなくその分子の分子量であり、分子構造やダイナミクスに関する情報を直接得ることは難しい。そのような情報を得るためには分光測定が適している。そこで本研究では、ESI 質量分析法とレーザー分光を組み合わせた装置の開発を行った。ESI で得られるイオンは室温状態であるため、そのまま分光測定を行うと、生体分子のようなフレキシブルな分子では種々のコンフォメーションの寄与による非常にブロードなスペクトルが観測される。イオンを極低温に冷却することができればコンフォメーションのゆらぎを止めることができ、超音速ジェット分光と同様にコンフォメーションを区別した分光測定が可能になる。Rizzo ら[2]はヘリウム冷凍機に設置した 22 極子イオントラップ[3]を用いて真空中に導入したイオンの極低温冷却を行っているが、本研究では取り扱いが簡便かつ飛行時間型質量分析器(TOF-MS)と組み合わせることができる四重極イオントラップ(QIT)[4]を採用した。本装置を用いることで、分子量の大きな分子のプロトン付加体や金属イオン錯合体、超分子などのコンフォーマー選別した電子スペクトルや赤外スペクトルを測定することができる。

装置の概略を図 1 に示す。ESI 部で生成したプロトン付加体を含む微細液滴を加熱キャピラリーに通して脱溶媒させ、イオンを真空中に導入する。六極子イオンガイドを用いて四重極質量分析器(Q-mass)に輸送し、特定の質量のイオンのみを選択する。続いて、イオンベンダーを用いてイオン軌道を直角に曲げ、八極子イオンガイドを用いて QIT に導入する。ヘリウム冷凍機に設置した QIT は約 5 K まで冷却されている。ここにイオン導入前にあらかじめ He ガスを導入し、冷えた He ガスで満たしておく。イオンは極低温 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イオンが

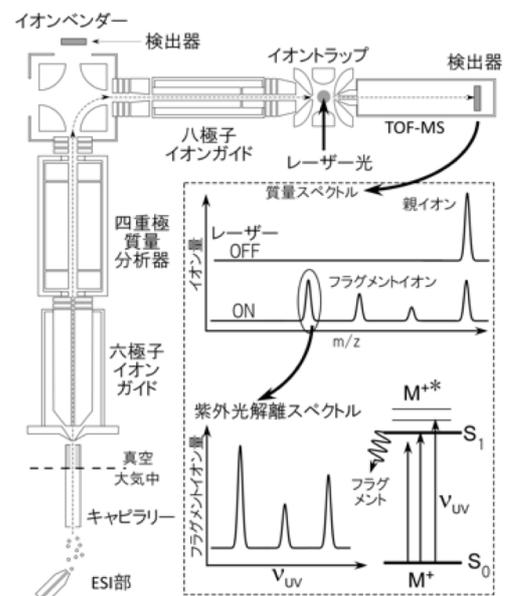


図 1 ESI/冷却イオントラップ装置の概略と光解離分光法の原理

生成する。これを TOF-MS 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。Johnson ら [5] や Jouvét ら [6]、Kim ら [7] もイオントラップとして QIT を使用しているが、本装置の特徴は QIT 前に設置した Q-mass とイオンペンダーである。Q-mass を用いることにより ESI 生成物の質量分析を行うことができ、ESI 部の最適化を図ることができる。また、イオンペンダーにより、中性分子の分離と、冷却に伴う QIT の位置のずれを目視により補正することができる。

はじめに市販 (Jordan TOF Products 社) のステンレス製の QIT を用いて装置を立ち上げ、デモンストレーションとして、プロトン付加チロシンの紫外光解離スペクトルを測定した (図 2.b)。測定の際には 107 amu のフラグメントイオン ($C_{\alpha}-C_{\beta}$ 結合開裂により生成) をモニターした。Rizzo らが測定したスペクトル (図 2.a) と比較すると、イオンの温度が高いためにホットバンドが確認でき、回転輪郭によりブロードニングしている。回転輪郭及びホットバンドの強度からチロシンの温度を推定したところ 45-50 K であり、QIT の温度 (約 5 K) とは大きく異なる。原因としては、1) QIT の高周波電場により He ガスとイオンの衝突が必要以上に誘起されイオンが He ガスの温度まで冷

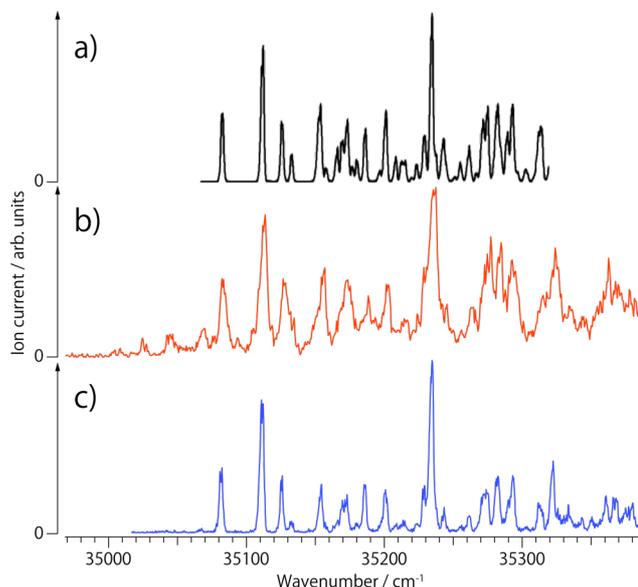


図 2 プロトン付加チロシンの紫外光解離スペクトル
a) Rizzo らによる 22 極子イオントラップ [8]、b) ステンレス製、c) 銅製イオントラップを用いた測定

えない (RF 加熱)、2) そもそも He ガスが冷えていないことが考えられる。これまで QIT は 22 極子イオントラップなどと比較して冷却効率が低いと言われており、その理由として専ら原因 1) が指摘されてきた。しかし QIT がステンレス製であることを考えると原因 2) の寄与は決して無視できない。4 K におけるステンレス鋼の熱伝導率は約 $0.3 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ であり、木材並みである。これでは QIT と He ガスの熱交換が十分に機能していない可能性が高い。そこで、冷却効率を改善するために極低温でも熱伝導率の高い銅 (4 K で約 $2000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) で QIT を作り直すことにした。プロトン付加チロシンの紫外光解離スペクトルを測定したところ (図 2.c)、各バンドはステンレス製 QIT による測定に比べ細くなり、またホットバンドもほとんど消失した。プロトン付加チロシンの温度は 17 K と見積もられた。QIT の温度は 7 K とステンレス製に比べ若干高くなったが (銅の電気伝導度がステンレスに比べて高く、電流がより多く流れたためだと考えられる)、それでもトラップされているイオンの温度はステンレス製に比べてかなり低く、我々の考察が正しかったことが裏付けられた。本研究で QIT でも十分な冷却効率が得られることが実証されたことは大きな意義をもつ。それは、22 極子イオントラップでは不可能なコンフォーマー選別電子スペクトルの測定が QIT では可能であり、それが十分に冷えた条件で測定できるようになったことでより正確なコンフォメーションの選別が可能になったからである。

【参考文献】 [1] J. Phys. Chem. 88, 4671-4675, (1984). [2] Rev. Sci. Instrum. 81, 073107 (2010). [3] Adv. Chem. Phys. 82, 1 (1992). [4] Mass Spectrom. Rev. 28, 961-989, (2009). [5] Int. J. Mass Spectrom. 300, 91-98, (2011). [6] J. Phys. Chem. Lett. 5, 1236-1240, (2014). [7] Int. J. Mass Spectrom. 337, 12-17, (2013). [8] Int. Rev. Phys. Chem. 28, 481-485, (2009).

アドレナリンとアドレナリンレセプター部分ペプチド

との錯合体の気相分光

石内俊一，輪胡宏学，藤井正明

東工大・資源研

神経伝達過程におけるシグナル伝達の最初の過程は神経伝達物質が受容体タンパク質に結合し分子を認識することである。この分子認識機構を分子レベルで理解するためには神経伝達物質と受容体の結合構造を解明することは必須である。神経伝達物質であるアドレナリンの受容体タンパク質 β_2 -アドレナリン受容体は非常によく研究されており、413 残基のアミノ酸からなる巨大な膜タンパク質である。アドレナリンとの結合は局所的に起こることが知られており、変異体を用いた実験及び計算機シミュレーションにより 2 つの Ser 残基の OH 基がアドレナリンのカテコール OH 基と水素結合するとされている[1]。最近、アドレナリンとの錯合体の X 線結晶構造が明らかになったが[2]、結晶構造からでは水素原子の位置は分からないため水素結合構造は明らかになっていない。また、2 つの Ser 残基が結合サイトである事は結果論であり、なぜそれらが結合サイトとして働くのか？タンパク質の局所構造でたまたまそうなのか、それとも、intrinsic な性質なのかは分からない。そこで、選択的な水素結合が受容体の結合部位を含む部分ペプチド SIVSF (図

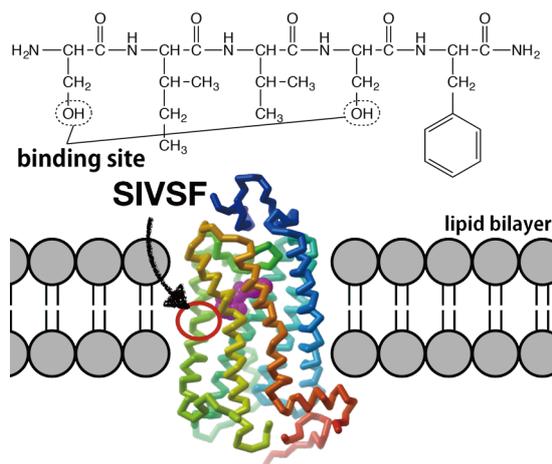


図1 β_2 -アドレナリン受容体と結合サイトの部分ペプチド SIVSF

1) とアドレナリンの錯合体でも実現されるのか、そしてその水素結合構造はいかなるものかを明らかにするため、錯合体の紫外及び赤外スペクトルを極低温気相孤立状態で測定することを目的とした。

錯合体の極低温孤立気相状態を得るためにエレクトロスプレー・冷却イオントラップ法を用いた。エレクトロスプレーでは錯合体のプロトン付加体が得ら

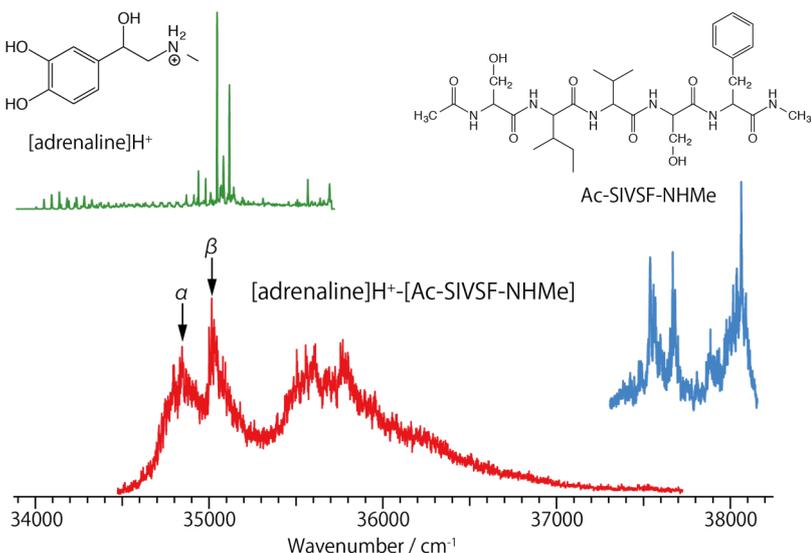


図2 錯合体及び各コンポーネントの紫外スペクトル

れるが、アドレナリンとペプチドでは前者の方が塩基性が強いため、プロトンはアドレナリンのアミノ基が担っていると考えられる。冷却イオントラップ中の錯合体イオンに紫外レーザーを照射し生成したフラグメントを検出し、紫外および赤外スペクトルを測定した。

図2に錯合体イオン及びプロトン付加アドレナリンの紫外光解離スペクトルを示す。また、比較のためにレーザー脱離・超音速ジェット法により測定した中性のSIVSFの紫外スペクトル(共鳴2光子イオン化スペクトル)も併せて示す。錯合体ではアドレナリンのカテコールとSIVSFのPheが紫外域に吸収をもつ。カテコールの吸収に相当する波長域を励起すると中性アドレナリンの脱離に対応する光解離フラグメントが観測された。一方でPheの吸収に対応する波長域を励起しても光解離フラグメントは観測されなかった。これは、Pheの励起状態と上述の光解離チャンネルとが位相空間的に離れており、また大きな分子内自由度のために共有結合を切る他の解離反応の速度も大きく低下しているためであると考えられる。

錯合体のスペクトルには 34800 cm^{-1} 及び 35000 cm^{-1} 付近にピークが観測されている(図中 α , β)。バンド α は緩やかな立ち上がりを示すのに対して、バンド β は急峻な立ち上がりを示しており、異なるFranck-Condonパターンを示している様に見える。このことから、両者は異なるコンフォーマーに由来していると考えられる。また、それぞれのピークから 700 cm^{-1} ほど高波数側にも二つのピークが観測されているが、これらはそれぞれのコンフォーマーのカテコール環の環呼吸振動が励起された振電バンドと考えられる。

バンド α , β が異なるコンフォーマーに由来しているかを確かめるために、それぞれのバンドに紫外光の波長を合わせてIR-UV2重共鳴スペクトル(赤外スペクトル)を測定した(図3)。両者は異なる赤外スペクトルを与えることから、異なるコンフォーマーであることが明らかになった。シャープな多数のバンド

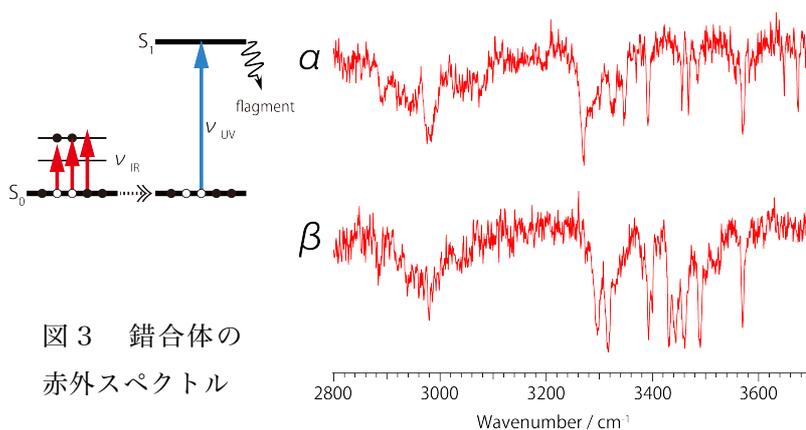


図3 錯合体の赤外スペクトル

が明瞭に観測されたため、理論計算との比較により明確な構造決定が可能であると期待される。また、観測されたバンドが非常にシャープであることから、同位体置換体($^{14}\text{N}\rightarrow^{15}\text{N}$)の測定により、各NH伸縮振動がどのアミノ酸に由来するかを実験的に帰属することが可能である。今後、理論計算及び同位体置換等の実験により錯合体の構造決定を行う予定である。

【参考文献】 [1] A. D. Strosberg, *Protein Sci.*1993, 2, 1198. [2] A. M. Ring. et al., *Nat.* 2013, 502, 575.

レーザー脱離超音速ジェット分光及び非調和振動解析による

ドーパミンの構造帰属

石内俊一¹, 藁科太一¹, 大滝大樹², 八木清², 杉田有治², 藤井正明¹

東工大・資源研¹, 理研・杉田理論分子科学²

カテコールアミンは神経伝達物質の一種であり、カテコール骨格にアミン側鎖を有する分子である。これらが神経細胞の先端から放出されて特定の受容体と結合することで神経シグナルが伝達される。この分子認識過程はしばしば鍵と鍵穴に例えられるが、鍵の役割を果たす神経伝達物質は複数の単結合をもち多数のコンフォメーションをとり得る柔軟な分子であり、なぜそのような分子が精密な鍵として機能するのか興味深い。この機構を理解する第一歩は、カテコールアミンおよび関連分子がどのようなコンフォメーションをとり得るのかを知ることである。しかし、常温溶液中では様々なコンフォメーションの間を揺らいでおり精密な構造解析は困難である。一方、超音速ジェット法を用いるとコンフォメーションの揺らぎを凍結することができ、各コンフォーマーを異性体として分光学的に分離観測することができる。我々はカテコールアミンおよびその関連分子に超音速ジェット法を適用し、それらのコンフォメーションを研究してきた[1]。しかし、カテコールアミンの中で唯一ドーパミンだけが手付かずであった。理由は、ドーパミンは空气中で容易に酸化されるため実験的な取り扱いが困難だったからである。その問題を解決するため、空気中でも安定な塩酸ドーパミンを用いた新規気化方法を開発し、ドーパミンの分光測定に成功した。共鳴多光子イオン化分光法および UV-UV ホールバーニング分光法を用いて、コンフォーマーを区別した電子スペクトルを測定し、5 個のコンフォーマーが共存していることを明らかにした。また、それらの構造を調べるためにコンフォーマーごとの赤外スペクトルを測定した(図 1 中段)。その結果、OH 伸縮振動および NH 伸縮振動の領域ではコンフォーマー間でほとんど差が見られなかった。一方、2800 cm^{-1} から 3000 cm^{-1} のアミン鎖の CH 伸縮領域では明瞭な差が観測された。この結果と量子化学計算で求めた理論スペクトルを比較すれば各コンフォーマーの構造決定が可能ではあるが、一般に CH 伸縮振動領域はモード間の非調和性が強いために、従来の調和振動解析では実験結果と比較し得る精度で理論スペクトルを得る事は困難である。そこで、ドーパミンの類似分子であり既に構造が決定されているフェニルエチルアミン (PEA) の赤外スペクトル (図 1 上段、図 2) と比較した。まずドーパミンの赤外スペクトルはバンドパターンから 2 つのグループに分けられる。ドーパミン A, B は 2880 cm^{-1} 付近に 2 本、2940 cm^{-1} 付近に 2 本のバンドが観測されている。一方、ドーパミン C, D, E は 2850 cm^{-1} 付近に 1 本の強いバンド観測され、2950 cm^{-1} 付近に 3 本のバンドが観測されている。次に PEA の赤外スペクトルを見ると、PEA1 及び PEA3 ではドーパミン A, B と同じパターンが観測されている。さらに振動数を比較することで、ドーパミン A, B は PEA1 と同じアミン鎖の構造を持ちカテコール OH 基の配向のみが異なると帰属した (図 3 a)。PEA2 ではドーパミン C, D, E と同じパターンが観測されている。したがってドーパミン C, D, E は PEA2 と同じアミン鎖構造でカテコール OH 基の配向が異なると帰属した (図 3 b)。これらの暫定的な帰属を確かめるために非調和振動解析を行

い、CH伸縮振動領域の非調和カップリングを考慮した赤外スペクトルを計算することにした。

PEA1-4と同じアミン鎖の構造を持つドーパミンのコンフォーマーa-dの非調和振動解析を行った。カテコールOH基の配向は複数考えられるが、その配向はCH伸縮領域のバンドパターンには殆ど影響しないため、それぞれ1種類のみを計算した。非調和振動解析にはSINDO[2]を用いた。まず、量子化学計算により基準座標を計算し、基準振動座標に基づいて4次のテイラー展開ポテンシャルを生成した[3]。生成したポテンシャルに対して振動擬縮退摂動法を適用し、振動固有状態を計算した[4]。ポテンシャル計算にはcam-B3LYP/cc-pVTZを用いた。

図1下段に非調和振動解析の結果を示した。まず非調和計算a及びcのバンドパターンは、ドーパミンA, Bのパターンと良く類似しているが、振動数を比較すると非調和計算aがドーパミンA, Bの実測スペクトルをよく再現している。従って、ドーパミンA, Bはコンフォーマーaのアミン鎖を持ち、カテコールOH基の配向が異なる構造であると帰属した。次に非調和計算bはドーパミンC, D, Eのバンドパターンを良く再現している。従って、ドーパミンC, D, Eはコンフォーマーbのアミン鎖を持ち、カテコールOH基の配向が異なる構造であると帰属した。非調和振動解析の結果より、PEAからの暫定的な帰属が正しいことが確かめられた。

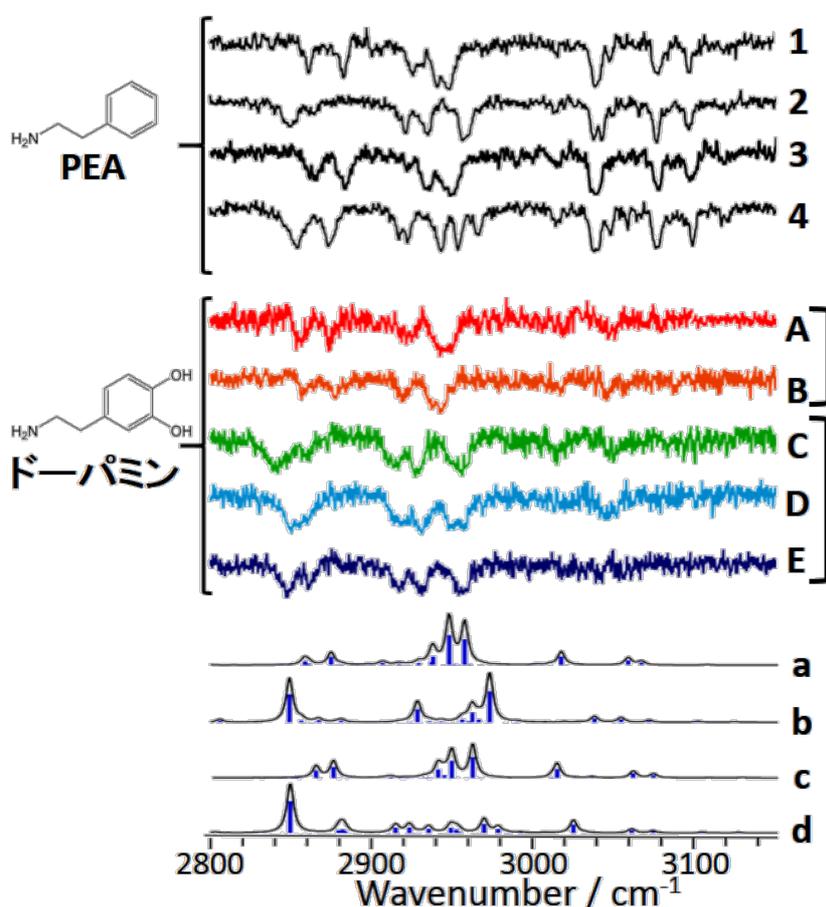


図1. PEAの赤外スペクトル（上段）とドーパミンの赤外スペクトル（中段）および非調和計算の比較（下段）

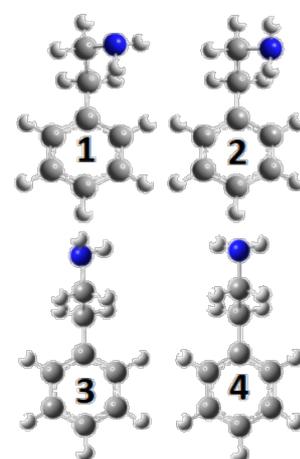


図2. 報告されているPEAのコンフォーマー

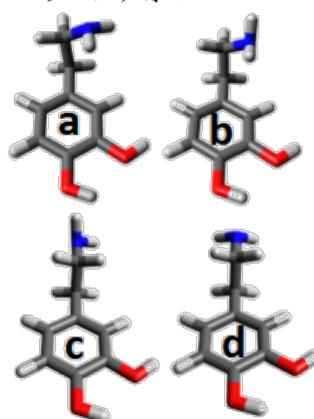


図3. PEAとの比較から帰属されたドーパミンのコンフォーマー

【参考文献】 [1] *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 1130., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13, 7812. [2] SINDO is a suit of programs including a PES generator and solver of the vibrational many-body problem developed by K. Yagi (Univ. of Tokyo). [3] *J. Chem. Phys.*, **2004**, 121, 3. [4] *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2008**, 10, 1781.