

周波数分光と時間分解分光から得られたモデル DNA 分子 7-アザインドール 2 量体のダブルプロトン移動機構の最終的結論

関谷 博 (九大院理・計画班代表者)
迫田憲治 (九大院理・計画研究分担者)

論文題目: "Excited-state double-proton transfer in a model DNA base pair. Resolution for stepwise and concerted mechanism controversy in the 7-azaindole dimer revealed by frequency- and time-resolved spectroscopy"

著者: Hiroshi Sekiya, Kenji Sakota

雑誌巻号: *J. Photochem. and Photobiol. C-Photochem.*

Rev. 9(2), 81-91 (2008)

DNA 塩基対に放射線が照射されるとプロトン移動により rare tautomer が生成し、発癌の原因となる可能性が Löwdin によって指摘された。それ以後、モデル塩基対の研究が盛んに行われてきた。7-アザインドール 2 量体 (7AI₂) はその中で最も詳細に調査された系である。著者らは、孤立状態の 7AI₂ のダブルプロトン移動 (ESDPT) 機構に焦点を当てながら、これまでの一連の研究についてレビューした。

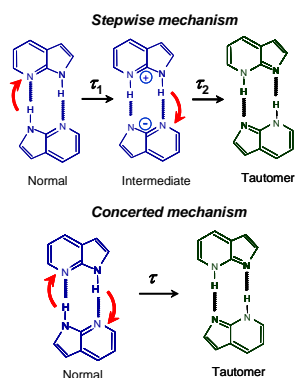


図 1 ESDPT の段階的機構と協奏的機構

7AI₂ の ESDPT 機構としては Kasha と Catalan らは、C_{2h} 対称性の 2 量体から協奏的な ESDPT が起こることを提案した(図 1)。これに対して、Zewail らは、気相におけるフェムト秒時間分解分光を用いて、2 重指数関数で再現される減衰曲線を観測し、これに基づき段階的機構を考えた。Castleman らは、クーロン爆発の実験において、7AI にプロトンが 1 個付加した反応

中間体の観測に成功したことを報告している。これら米国の 2 グループの報告によって、段階的機構がかなり優位となった。しかしながら、A02 班の竹内と田原は、溶液中の 7AI₂ のフェムト秒時間分解分光を行い、0-0 遷移の近傍を励起すると励起状態の減衰は単一指数関数で表されることを示し、段階的機構を否定した。Catalan らは、協奏的機構で ESDPT が起こることを更に強く主張した。2 つの機構のどちらが正しいかについての論争は、10 年以上も続いている。

著者らは、孤立気相状態における 7AI₂ および重水素置換体について周波数分光とピコ秒時間分解分光を適用して、励起状態のエキシトン相互作用、振電状態を選別した ESDPT 速度およびその重水素置換効果について詳細に調査した。その結果、以下の結論を得た。(1) 反応始状態となるエノール型 2 量体の最低励起状態において、Frenkel 型の weak coupling case に分類されるエキシトン相互作用が存在する。したがって、励起移動に沿ったポテンシャル曲線は対称 2 極小型となる。この結果は、Kasha や Catalan らが考えた C_{2h} 対称が正しくないことを示している。(2) 励起状態の減衰が単一指数関数で再現できること及び 2 個の NH 基の 1 個が重水素置換された 7AI-*h*d* または 7AI-*hd** を励起した場合 (*は励起された単量体ユニットを示す) の ESDPT 速度の同位体効果は 1.4 であり、推定される値 (>10) に比べて著しく小さい。これらの結果は、段階的機構を強く否定する結果である。(3) ESDPT ポテンシャル上に中間状態に対応する極小が存在することを示す実験的証拠はない。すなわち、ESDPT 機構は、図 1 に示した Zewail らの定義に基づく協奏的機構と結論される。

それでは、Zewail らが観測した 2 重指数関数の減衰曲線の起源はどこにあるか? この問いに対する回答は、A01 班の富宅らが 7AI₂ について初めて示した ESDPT 速度の振動モード選択性から容易に推察できる。励起に使用されたフェムト秒レーザーのパルス幅が広い (~100 cm⁻¹) ので、励起状態の寿命が短い分子間伸縮振動 (σ) とこれより寿命がかなり長い 0-0 遷移または分子間変角振動 (β) を同時に励起すると異なる時定数をもつ減衰が観測されるはずである。

業績紹介：気相における化学反応中間体構造を赤外分光で観測

藤井朱鳥 (東北大院理・A01 計画班)

論文題目: "Observation of an Isolated Intermediate of the Nucleophilic Aromatic Substitution Reaction by Infrared spectroscopy"

著者: Hayato Hasegawa, Kenta Mizuse, Masaki Hachiya, Yoshiyuki Matsuda, Naohiko Mikami, and Asuka Fujii

雑誌巻号: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6008-6010.

芳香族クラスターカチオンと極性溶媒分子のクラスターは、charge-dipole 相互作用や CH-X 水素結合、そして電荷移動など様々な分子間相互作用の競合により分子間構造が定まる興味深い系である。我々はこれまでにベンゼンカチオンと水、メタノール、アンモニアとのクラスター構造を赤外分光で決定してきた。相互作用強度の増大に伴って分子間構造は変化していくが、最も相互作用が強くなるベンゼン-アンモニアクラスターカチオンでは、ベンゼンπ軌道のホールにアンモニアの非共有電子対が電子を供与する形で C-N 分子間に新しい共有結合が生じることが分かった[1]。これは芳香族置換反応で一般的に仮定されるσ-complex の構造である。過去に、ハロゲン置換ベンゼンと溶媒分子のクラスターを光イオン化することにより求核置換反応が起きることが Brutschy や前山・三上により報告されており[2,3]、ベンゼン-アンモニアカチオンはこの特異なクラスター内求核置換反応における中間体のプロトタイプと見なすことができる。しかしベンゼン-アンモニア系は脱離基となるのが抜けにくい水素であるため、σ-complex 生成で反応が止まってしまい、置換反応は実際には起きない。

クラスター内芳香族求核置換反応では芳香族分子にハロゲンを導入することにより反応最終段の脱離が効率よく進む。そこで今回、ヘキサフルオロベンゼン C₆F₆ とアンモニアの組み合わせに着目し、1:1 クラスターカチオンの構造を赤外分光で探ることを試みた。C₆F₆ はアンモニアの付加が起きた場合、付加位置による ortho, meta, para の構造異性がないので構造を決定しやすいという利点があるが、その反面、フッ素置換によりπσ*状態のエネルギーが下がるため、高速の内部転換により第1電子励起状態が短寿命となり、芳香族分子のイオン化で常用される共鳴多光子イオン化が適用できないという問題があった。そこでコヒーレン

ト真空紫外光による1光子イオン化を利用して、C₆F₆/NH₃ 混合系の効率良いイオン化を行った。その結果、反応生成物 C₆F₅NH₂⁺の強いピークが質量分析で見られ、NH₃の付加と HF の脱離による求核置換反応が実際に起きていることが確認された。下図にイオン化によって反応生成物と共に生成する(C₆F₆-NH₃)⁺の赤外スペクトルを示す。実測スペクトルの N-H 伸縮振動によるバンドはアンモニア部の N 原子と芳香環の C 原子との間に共有結合を生成したσ-complex 型構造でのみよく再現され、1:1 クラスターが反応中間体構造をとっていることを示している。これは実際に最終反応物生成に至る芳香族求核置換反応中間体を気相において観測した初めての例である。

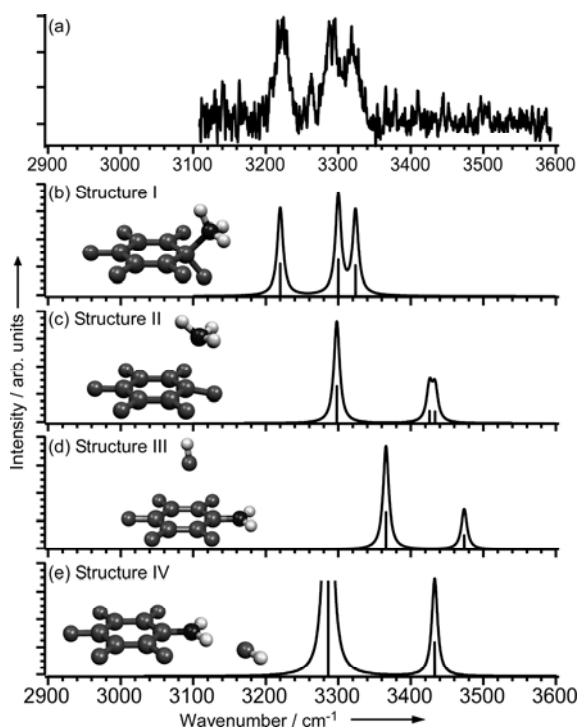


図 (C₆F₆-NH₃)⁺クラスターカチオンの赤外スペクトル (a)実測スペクトル (b)-(e) 密度汎関数法による安定構造とスペクトルシミュレーション

[1] K. Mizuse, A. Fujii, N. Mikami, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 6387-6390.

[2] O. Dimopoulou-Rademann, K. Rademann, P. Bisling, B. Brutschy, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 215-217.

[3] T. Maeyama, N. Mikami, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7238-7239.

業績紹介：バクテリオロドプシンの内部結合水に対する時間分解赤外分光解析

神取秀樹 (名工大院工・公募研究代表者)

論文題目："Active internal waters in the bacteriorhodopsin photocycle. A comparative study of the L and M intermediates at room and cryogenic temperatures by infrared spectroscopy"

著者：Victor A. Lorenz-Fonfria, Yuji Furutani, and Hideki Kandori

雑誌巻号：Biochemistry 47, 4071-4081 (2008)

最も理解の進んだプロトンポンプ蛋白質であるバクテリオロドプシンの場合、4 個のプロトン結合基を經由する 5 回のプロトン移動の結果として 5 ナノメートルほどの膜を貫通してプロトンが能動輸送される[1]。このうちプロトン放出基だけは未解明であり、細胞外側部位にある Glu194, Glu204 の解離の信号が赤外分光によって捉えられなかったため、その候補として消去法的に水が考えられてきた。同様に、疎水的な蛋白質内部でのプロトン移動を実現するため、蛋白質の内部結合水が重要な役割を果たしていることが考えられたが、我々は低温赤外分光を用いて実験的に水の信号を捉えることに成功している[2]。そして、プロトンポンプ活性をもつ蛋白質には強い水素結合を形成した水分子が存在することを発見し、内部結合水の水素結合が機能と深い関わりをもつことを明らかにした[3]。この経験則はまた、低温分光によって明らかになった基底状態の水分子の水素結合構造が、生理的な条件にも当てはまることを示唆している。それでは、過渡的に生成する中間体ではどうだろうか？

ロドプシンの分野では、室温と低温の中間体が同様の構造をもつと

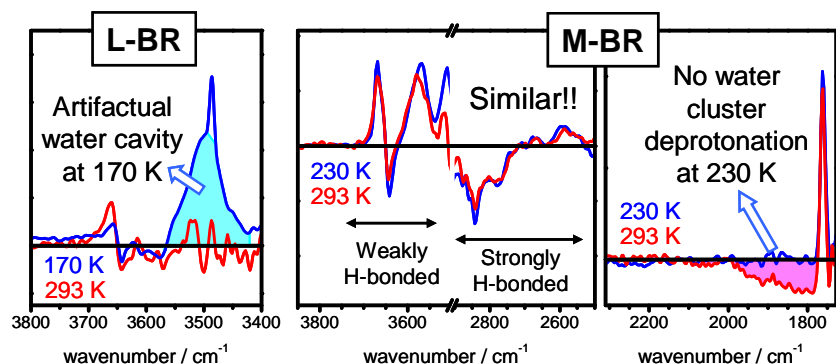
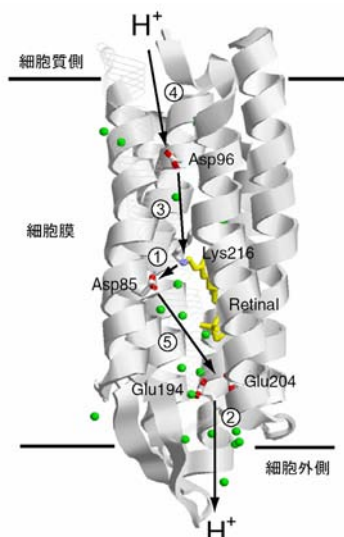
信じられているが、内部に結合したわずか 1 個の水に当てはまるという保証はない。

今回、我々は時間分解赤外分光法を用いて、最初のプロトン移動の前後に生成する L, M 中間体における内部結合水の信号を計測し、低温の実験結果と比較した。さらにプロトン放出基としての水クラスターについて検討した。水含量を厳密に制御した試料に対して、レーザー励起 (532 nm) と同期させたステップスキャン法 (時間分解能 5 μ s) によって、初めて 4000-800 cm^{-1} の波数領域での高精度の赤外差スペクトル測定が実現した。その結果、170 K の L 中間体に特徴的な水素結合の弱い水のクラスター構造は低温のアーティファクトであることがわかった。一方、230 K の M 中間体の水のスペクトルは室温とよく一致していた。水の信号に対する両中間体の差には、ガラス転移温度が関わる蛋白質ダイナミクスが影響しているものと考えられる。

プロトン放出基に関しては、2000-1800 cm^{-1} のブロードな負の信号が、プロトン化水クラスターに由来すると提唱されてきたが実験的な証拠はなかった。我々は本研究において注意深い実験から水の同位体効果を観測し、ブロードな信号には水の振動が含まれることを明らかにした。蛋白質内部という疎水環境において、 $\text{Glu194}^--\text{water}^+-\text{Glu204}^-$ という構造が安定に存在するらしい。興味深いことに 230 K ではこのような負の信号は観測されなかった。本特定領域のキーワードである水の特異性が示された研究例ということができる。

引用文献

- [1] 神取秀樹, 日本物理学会誌 56, 75-82 (2001).
- [2] H. Kandori, *Biochim. Biophys. Acta* 1460, 177-191 (2001); *ibid* 1658, 72-79 (2004).
- [3] Y. Furutani, M. Shibata and H. Kandori, *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 661-666 (2005).



ミニ公開シンポジウム「イオンチャネルの構造ダイナミクス」報告

清水啓史 (福井大・医・A03 班)

本特定領域研究のミニ公開シンポジウムが、平成 20 年 7 月 8 日 (火)、9 日 (水) に、AOSSA (福井県福井市手寄)、福井大学松岡キャンパス (福井県吉田郡永平寺町) で開催されました。本シンポジウムは、今年度の第三回合同班会議をきっかけにイオンチャネルに関する領域内の共同研究の機運が高まったため、メンバー間の相互理解やチャネル研究についての情報および問題意識の共有を目的に開催されたものです。

最初に、老木成稔氏から、イオンチャネル研究全体についての説明がなされました。チャネル研究全般を概観し、どのような点が面白いのかについて解説がありました。続いて清水啓史氏 (A03 班) から共同研究の対象となる KcsA チャネルに関して、現在までに明らかになっている事柄についてのレビューがなされました。チャネルの構造ダイナミクスについて活発な意見交換がありました。次に、楯真一氏 (A03 班) から、異方性核スピン相互作用を利用した新規 NMR 技術について、原理、および対象とする分子形態変化について解説がなされ、チャネルを対象とした場合の狙いと研究の進行状況について説明がありました。

休憩をはさみ、南後守氏 (A02 班) から光合成アンテナ複合体を例に電極基板上への膜蛋白質の組織化法と機能測定法についての解説がありました。続いて出羽毅久氏 (A02 班) から繋ぎ止め平面脂質二分子膜の構築法の詳細、膜蛋白質の導入法についての説明がなされ、チャネルへの応用について展望が示されました。山方啓氏 (A02 班) からは電気化学的手法を用いた電位トリガー印加法と時間分解 ATR-IR 測定の詳細について説明があり、チャネルに応用した際の問題点について意見が交わされました。この日の最後に神取秀樹氏 (A02 班) から赤外分光法のチャネル研究への応用方法について、装置設計を含んだ解説がありました。情報交換や議論は、この日の研究交流会の時間を利用して深夜まで続けました。

翌朝から福井大学に場所を移して研究会が行われました。始めに石橋孝章氏 (A02 班) から振動電子二重共鳴 SFG 分光法について、原理、および応用例について解説があり、チャネル研究への応用について展望が示されました。次に古谷祐詞氏 (A01 班) より水和

試料を用いた ATR-FTIR 法についての説明があり、具体的にチャネルのどの部位の構造ダイナミクス情報を得るかについて展望が示されました。また、神取秀樹氏 (A02 班) より赤外分光法によって明らかになったバクテリオロドプシンのプロトン伝導について解説がありました。古谷氏、神取氏の講演は福井大学大学院セミナーを兼ねて行われ、福井大学の大学院生、教職員の参加がありました。最後に共同研究の具体的な進め方について討議が行われました。討議の結果、共同研究が 2 者間で収まるのではなく、3 者、4 者の連携・協力関係によって発展的に行われることとなり、研究会の意義が大きかったことを強く印象付けるものとなりました。シンポジウムの講演者は講演順に以下のとおりです。

プログラム

8 日 (於 AOSSA 内 会議室 501 13:30-19:00)

老木成稔(福井大学・医・分子生理)、清水啓史 (福井大学・医・分子生理、A03 班)、楯 真一 (広島大学・理・数理分子、A03 班)、南後 守 (名古屋工業大学・物質工学、A02 班)、出羽毅久 (名古屋工業大学・物質工学、A02 班)、山方 啓 (北海道大学・触媒化学研究センター、A02 班)、神取秀樹 (名古屋工業大学・未来材料、A02 班)

9 日 (於 福井大学 3F 会議室 9:00-12:30)

石橋孝章 (広島大学・理・化学、A02 班)、古谷祐詞 (名古屋工業大学・未来材料、A01 班)、神取秀樹(名古屋工業大学・未来材料、A02 班)

シンポジウムの開催を支えていただいた東工大藤井先生、大阪大学水谷先生、高次系事務局のみなさんと、準備・進行をお手伝いいただいた福井大学のスタッフの皆さんに深く感謝します。

