

## 業績紹介： 7-アザインドールの<sup>1</sup>L<sub>a</sub>と<sup>1</sup>L<sub>b</sub>状態のどちらの電子状態からプロトン移動は起こり易いか？

迫田憲治 (九大院理・計画班分担者)  
関谷 博 (九大院理・計画班代表者)  
論文題目: Probe of the NH strength in 1L<sub>a</sub> and 1L<sub>b</sub> states of 7-azaindole with IR-dip spectroscopy: Insights into the electronic-state dependence of the multiple-proton / hydrogen transfers in hydrogen-bonded clusters  
著者: Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya  
雑誌巻号: *Journal of Physical Chemistry A (Letter)*, **113**, 2663-2665 (2009)

7-アザインドール2量体(7AI<sub>2</sub>)や7-アザインドール・メタノール1:2クラスター[7AI(CH<sub>3</sub>OH)<sub>2</sub>]は、励起状態プロトン/水素移動[Excited-state multiple proton/H transfer (ESMPT/HT)]のモデル分子として注目されている。7AIには近接した二つの励起状態<sup>1</sup>L<sub>a</sub>と<sup>1</sup>L<sub>b</sub>が存在する。ab initio計算によると、<sup>1</sup>L<sub>b</sub>は6員環の局在励起状態であるが、<sup>1</sup>L<sub>a</sub>は5員環から6員環への電荷移動が起きた性質もっているために、<sup>1</sup>L<sub>b</sub>より極性が大きい。<sup>1</sup>L<sub>a</sub>と<sup>1</sup>L<sub>b</sub>のどちらが、ESMPT/HTに有利であるかという点に興味もたれているが、この点について調査した報告はない。本研究では、<sup>1</sup>L<sub>a</sub>と<sup>1</sup>L<sub>b</sub>の性質の違いとESMPT/HTとどのような関係があるかについて、7AI単量体に蛍光検出赤外ディップ分光を適用して調査した。

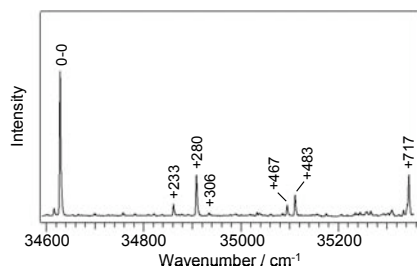
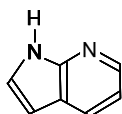


Fig. 1 7AIの蛍光励起スペクトル

Fig. 1に7AIの0-0遷移領域の蛍光励起スペクトルを示す。0-0遷移の他に6本の振電バンドが現れている。これらのバンドを紫外レーザーで励起し、赤外ディップスペクトルを観測した。Fig.2にはS<sub>0</sub>のNH伸縮振動と7つの励起状態のNH伸縮振動が観測されている。S<sub>0</sub>の振動数と比べて励起状態の振動数は

低振動数側にシフトしている。このことは、励起状態のNH結合が弱くなっていることを示している。励起状態のスペクトルb-hを比べると、0-0遷移から+280 cm<sup>-1</sup>のスペクトルにおいては、NH振動数はS<sub>0</sub>の振動数から顕著に(47 cm<sup>-1</sup>)レッドシフトしている。ところが、他のスペクトルにおいて、NH振動数は、殆ど変化していない。Kangらは、高分解能電子スペクトルの測定から+288 cm<sup>-1</sup>のバンドを<sup>1</sup>L<sub>a</sub>と<sup>1</sup>L<sub>b</sub>状態が混ざったバンドに帰属している<sup>1)</sup>。この帰属と本研究の結果には矛盾がないが、+288cm<sup>-1</sup>のバンドがS<sub>0</sub>→<sup>1</sup>L<sub>a</sub>(0-0)遷移か、あるいは<sup>1</sup>L<sub>a</sub>/<sup>1</sup>L<sub>b</sub>混合バンドへの遷移かについては区別できない。

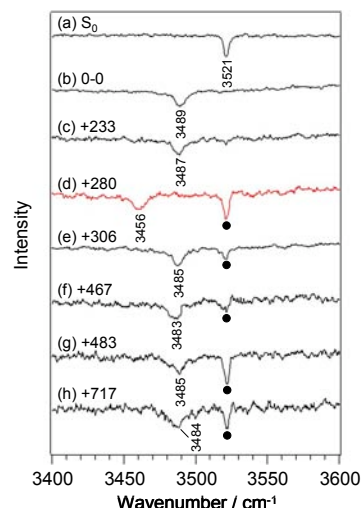


Fig. 2 7AIのS<sub>0</sub>(a)とS<sub>1</sub>(b-h)の蛍光検出赤外ディップスペクトル

7AI(CH<sub>3</sub>OH)<sub>2</sub>において、<sup>1</sup>L<sub>a</sub>は<sup>1</sup>L<sub>b</sub>に比べて極性が大きいのでNHとCH<sub>3</sub>OHの分子間水素結合距離が<sup>1</sup>L<sub>b</sub>に比べて短くなる。また、<sup>1</sup>L<sub>a</sub>においてはNH結合が<sup>1</sup>L<sub>b</sub>より弱いので、プロトン/水素移動反応座標に沿ったポテンシャルが浅くなる。これらの効果によってプロトン/水素移動障壁が低下し、反応が促進される。本研究から、7AI(CH<sub>3</sub>OH)<sub>2</sub>において、<sup>1</sup>L<sub>a</sub>からESMPT/HTが効率的に生じることが合理的に説明できる。この結果は、他のクラスターにおけるESMPT/HTについて考察する際にも有用である。

1) C. Kang et al. *J. Chem. Phys.* **123**, 094306(2005).

## 業績紹介：チラミン分子の超音速ジェットレーザー分光

眞柄宏司 (東工大大学院修士 1 年)、藤井正明 (東工大資源研・計画研究代表者)

論文題目: "Vibrational Signature of the Conformers in Tyramine Studied by IR Dip and Dispersed Fluorescence Spectroscopies"

著者: Koji Makara, Kentaro Misawa, Mitsuhiko Miyazaki, Haruhiko Mitsuda, Shun-ichi Ishiuchi, and Masaaki Fujii  
雑誌巻号: J. Phys. Chem. A, **112**, 13463-13469 (2008)

我々は「分子クラスターから細胞に至る分子認識系の光励起ダイナミクスと素過程解明」を目標に研究を行っている。神経伝達過程は生体における精緻な分子認識の例であり、その過程では神経伝達物質と受容体の分子構造が極めて重要である。従って、神経伝達物質および受容体、あるいはそれらのクラスターのコンフォメーションを詳細に理解することが必要である。

モノアミン芳香族分子の一種であるドーパミン、アドレナリンやチラミンは代表的な神経伝達物質である。これらの分子に共通する特徴は、分子がフレキシブルなメチレン鎖を持つために複数のコンフォメーションを有するという点である。しかし、常温では分子は絶えず様々な状態の間を揺らいでおり、コンフォメーションを特定した観測は困難である。

超音速ジェット法はこの問題の解決に極めて有効である。この方法は高圧の気体をノズルから真空中に噴射することにより、分子を気体のまま極低温まで冷却するとともに、分子間衝突のない孤立状態を実現する方法である。超音速ジェット法により分子の内部状態はポテンシャルの極小点に固定されるため、種々のレーザー分光法を適用して、特定のコンフォマーを選択的に観測することが可能となる。

神経伝達物質チラミン分子に関しては様々なグループが実験、理論両面から研究している。最近では Yoon らによりチラミンの共鳴多光子イオン化スペクトル (紫外吸収に相当) と UV-UV ホールバーニングスペクトルが測定され、その回転輪郭と量子化学計算により 7 つのコンフォマーの構造が帰属された [1]。しかし回転輪郭による構造帰属は確定的とは考えられず、他の方法による帰属の検証が不可欠である。そこで、我々は赤外分光法および分散蛍光分光法を用いて、分子振動によるチラミン分子のコンフォマーの帰属を行った。

実験では、高温加熱用に改良したパルスバルブを用い、加熱気化したチラミンをヘリウムガスと共に真空中に噴射してジェット冷却した。これに IR-UV 二重共鳴分光法を適用し、コンフォマー毎の IR dip スペクトルを測定した。また、個々のバンドからの分散蛍光スペクトルを測定した。Gaussian03 を用いた量子化学計算 (B3LYP/ aug-cc-pVDZ) により構造最適化と振動数計算を行い、これに基づいて観測された基底状態の振動を帰属した。

IR Dip スペクトルおよび分散蛍光スペクトルによる振動解析の結果、メチレン鎖の C-H 伸縮振動がチラミン分子の N-C $\beta$  のコンフォメーションの違いを示す特徴的なシフトとして観測され、一方、芳香環の C-H 面外変角振動がチラミン分子の C $\beta$ -C $\alpha$  のコンフォメーションについて特徴的な "Key Vibrations" であることが明らかとなった。以上の解析によりチラミンの 7 種のコンフォマーの構造を帰属し、本論文はチラミンの構造に関して最終結論を与えるものとなった。

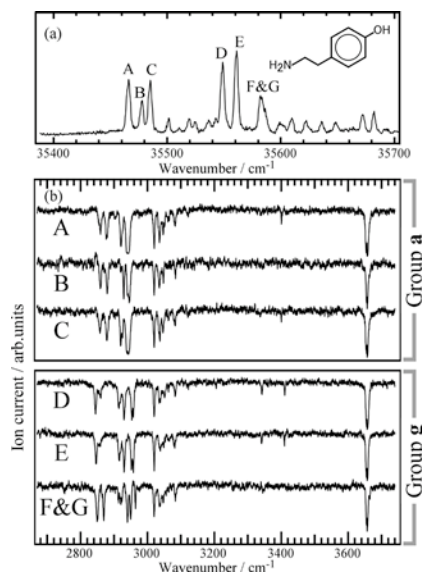


図1 チラミンの (a)LIF スペクトル (b)IR Dip スペクトル

[引用文献]

[1] I. Yoon, K. Seo, S. Lee, Y. Lee, and B. Kim, J. Phys. Chem. A **111** (10), 1800 (2007)

## 業績紹介：生きた細胞内の蛋白質の立体構造決定に成功

伊藤 隆（首都大院理工・公募研究代表者）

論文題目："Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy"

著者：Daisuke Sakakibara, Atsuko Sasaki, Teppei Ikeya, Junpei Hamatsu, Tomomi Hanashima, Masaki Mishima, Masatoshi Yoshimasu, Nobuhiro Hayashi, Tsutomu Mikawa, Markus Wälchli, Brian O. Smith, Masahiro Shirakawa, Peter Güntert, and Yutaka Ito

雑誌巻号：Nature 458, 102-105 (2009)

細胞内での蛋白質の機能発現のメカニズムを厳密に理解するためには、単離・精製した試料の解析だけでなく、生細胞環境における立体構造や構造変化や相互作用を解析する必要があるのではないかと議論がされるようになってきている。NMR 法は非侵襲性に優れ、かつ原子分解能での解析が可能ことから、生細胞環境での蛋白質の詳細な解析に適していると考えられてきた。しかし、2001 年に生細胞中の蛋白質について異種核多次元 NMR を測定する方法 (in-cell NMR) が提案されたあとでも、単離・精製した蛋白質の高次構造解析に用いられる様々な手法が生細胞試料にも適応可能かどうかという問題は検証されずにいた。

今回、私たちは高度好熱菌由来の TTHA1718 遺伝子産物 (66 アミノ酸残基) をモデル試料として大腸菌中で大量発現させ、生きた大腸菌をそのまま試料とすることで、細胞内 TTHA1718 の立体構造解析を試みた。

まず、6 種類の 3 重共鳴 3 次元 NMR スペクトルを解析することで蛋白質主鎖 NMR シグナルの帰属を行った。3 次元 NMR 測定の際には非線形サンプリング法を用いた。この手法と最大エントロピー法によるデータ処理によって、多次元 NMR 測定時間が著しく短縮されることが既に報告されている。解析の結果、観測可能な主鎖 NMR シグナルのほとんどの帰属に成功した。同様の手法を用いることで、大多数の側鎖 NMR シグナルも帰属することができた。

次に、Ala/Leu/Val 残基の側鎖メチル基のみが  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  標識されている (他の部分は  $^2\text{H}$  標識されている) 試料を作成し、in-cell NMR 測定を行った。この試料を用いることで、蛋白質の疎水的コアの形成に関わるメチル基間の距離情報を効率的に取得することができた。さらに、均一に  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識された細胞試料を用いて測

定した 3D  $^{15}\text{N}$ -separated NOESY と 3D  $^{13}\text{C}$ -separated NOESY から距離情報を取得した。

立体構造計算は、上記 NOE 由来の距離情報、 $^{13}\text{C}$  核の化学シフトから推定した主鎖 2 面角情報、2 次構造部分に推定された水素結合情報から、CYANA プログラムを用いて行った。得られた高次構造は主鎖 RMSD が  $0.96 \text{ \AA}$  と良好であり (図 1a), 独立に決定した精製試料の高次構造とも非常に良く似ていた (図 1b)。

今回の研究結果は、大腸菌の細胞質に存在する蛋白質の詳細な立体構造が解析可能であることを強く示唆している。非線形サンプリング法 (と最大エントロピー法によるデータ処理) によって短時間で良好な 3 次元 NMR スペクトルが得られたこと、メチル基選択的な  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  標識によって "long-range" の NOE 情報を誤りなく同定できたこと (図 1c,d,e) が、今回の成功の「鍵」であると考えられる。

この in-cell NMR の手法を拡張していくことによって、生細胞環境における蛋白質の詳細な高次構造や、さまざまな生物現象に伴う高次構造変化が解析されるようになるのではないかと期待される。特に、単離・精製した状態では特定の構造を持たないいわゆる "intrinsically disordered protein" に対する細胞内の "molecular crowding" の影響の解析などが次の興味深い研究例となるであろう。

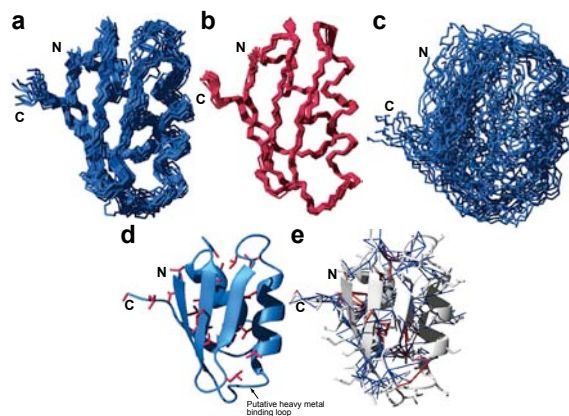


図 1. TTHA1718 の生細胞中の高次構造。a, 生細胞中の構造 (最終構造 20 個) の重ね合わせ。b, 精製試料の構造 (最終構造 20 個) の重ね合わせ。c, メチル基選択的標識試料由来の距離情報を用いなかった場合の計算結果。d, TTHA1718 の 2 次構造と Ala/Leu/Val 残基の位置。e, 高次構造計算に用いた全ての NOE 由来の距離情報 (メチル基関連の NOE 情報は赤太線で表示)