

業績紹介：神経伝達物質におけるカテコールのフレキシビリティ束縛効果の発見

石内俊一（東工大資源研・A01 計画研究分担者）
藤井正明（東工大資源研・A01 計画研究代表者）

論文題目：“Evidence for Catechol Ring-Induced Conformational Restriction in Neurotransmitters”

著者：Haruhiko Mitsuda, Mitsuhiko Miyazaki, Iben B. Nielsen, Pierre Çarçabal, Claude Dedonder, Christophe Jouvret, Shun-ichi Ishiuchi, and Masaaki Fujii

雑誌巻号：J.Phys. Chem. Lett., **1**, 1130-1133 (2010)

神経伝達物質は、特定のレセプターに分子認識される事によって、神経細胞間での情報伝達を担う分子であり、両者は鍵と鍵穴に例えられる。その分子認識機構の解明は、分子科学や生化学などの基礎科学からの興味だけでなく、特定のタンパクの活性を制御する鍵分子に如何に高いレセプター選択性をもたせるかがキーとなる近年の創薬において極めて重要な課題である。

本研究で取り上げたカテコールアミン（図 1）は最も代表的な神経伝達物質であり、脳内物質として極めて重要な分子である。本研究では、それらの分子認識機構に対して分子論的にアプローチする事を目指して、その第一歩として、カテコールアミンの気相中におけるコンフォメーションを調べる事を目的とした。

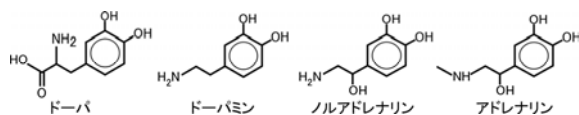


図 1 カテコールアミン神経伝達物質

レーザー脱離法を用いてカテコールアミンを気化し、真空中に導入した。これを希ガスパルスジェットで衝突冷却した。これに波長可変紫外レーザーを照射して共鳴 2 光子イオン化（R2PI）し検出した。紫外レーザーの波長がジェット中の分子の電子遷移エネルギーに一致すると R2PI が起こるので、イオン量をモニターしながら紫外レーザーを波長掃引する事で、電子スペクトル（R2PI スペクトル）を測定した。

図 2 a にドーパの R2PI スペクトルを示す。電子遷移エネルギーはコンフォマー毎で異なるため、もし複数のコンフォマーが共存すると、R2PI スペクトルはそれらの重ね合わせとなる。それらを区別するためにホールバーニング（HB）スペクトルを測定した（図 2 b）。この方法では、R2PI スペクトルの特定のバンド（図中*）に第 1 の紫外レーザー（ ν_p ）を固定し、イオン量

をモニターする（図 2 c）。このイオン量は特定コンフォマーの基底状態の分子数に比例する。 ν_p よりも前に第 2 の紫外レーザー（ ν_B ）を照射し波長掃引する。 ν_B が特定コンフォマーの電子遷移に共鳴すると、その基底状態の分子数は減少し、イオン量も減少する。従って、 ν_p によってプローブしているコンフォマーの電子遷移をイオン量の減少として抽出できる。ドーパの R2PI 及び HB スペクトルを比較すると、両者はよく一致しているため、R2PI スペクトルには単一のコンフォマーが観測されている事が分かる。

ドーパより OH 基の 1 つ少ないチロシンでは 8 個のコンフォマーが観測されており[1]、ドーパでは側鎖のフレキシビリティが著しく束縛されている事が分かる。両者の差は、側鎖の *m*-位の OH 基の有無であり、これがドーパの側鎖束縛に寄与している可能性がある。そこで、チロシンの異性体であるメタチロシン（*m*-位に OH 基をもつ）に対して同様の実験を行った。その結果、14 個のコンフォマーが観測され、*m*-位の OH 基だけでは側鎖束縛効果は現れない事が分かった。

既に研究されているノルアドレナリン[2]、アドレナリン[3]についても、ドーパと同様、少数のコンフォマー（それぞれ 1 個、2 個）をとる事が報告されている。この事から、カテコール環はその側鎖のフレキシビリティを束縛する効果をもつ事が考えられ、その様な効果は、2 つの OH 基が揃って初めて誘起される事が明らかとなった。鍵分子として極めて重要なカテコールアミンのこのような性質は、その分子認識過程において何か重要な意味をもつのかかもしれない。

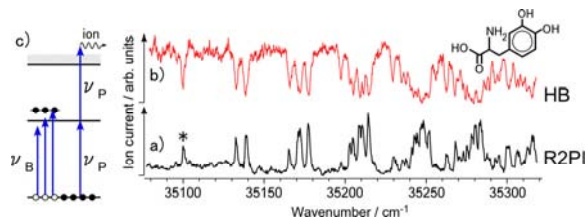


図 2 ドーパの a) R2PI スペクトル、b) HB スペクトル及び c) HB 分光法の原理

[1] Y. Inokuchi, Y. Kobayashi, T. Ito, T. Ebata, *J. Phys. Chem. A* **111**, 3209-3215 (2007).

[2] L. C. Snoek, T. Van Mourik, J. P. Simons, *Mol. Phys.* **101**, 1239-1248 (2003).

[3] P. Çarçabal, L. C. Snoek, T. Van Mourik, *Mol. Phys.* **103**, 1633-1639 (2005).

業績紹介: 非走査型 VSFG 検出赤外超解像顕微鏡の開発と細胞への応用

井上圭一 (東工大資源研・計画研究連携者)
藤井正明 (東工大資源研・計画研究代表者)
酒井 誠 (東工大資源研・計画研究分担者)
論文題目: "Development of a Non-scanning VSFG detected IR Super-resolution Microscope and its Application to Biological Cells "

著者: Keiichi Inoue, Masaaki Fujii, Makoto Sakai,
雑誌: Applied Spectroscopy, Vol.64, 275 (2010)

生体分子の構造解析において、官能基の振動モードに敏感で分子の構造や環境を鋭敏に反映する赤外分光法は有用であり、微小試料観察には赤外顕微鏡が用いられている。通常の赤外顕微鏡では、回折限界の制約により空間分解能を数 μm より小さくすることが出来ない。しかし、筆者らは過渡蛍光検出赤外分光法を顕微鏡に適用し、赤外吸収を可視発光に変換して検出することで可視光の高い空間分解能で赤外像を観察可能な赤外超解像顕微鏡の開発を行い、実際に蛍光色素で染色した細胞に適用した結果を以前に報告した¹⁾。

本論文では、新たに振動和周波発生(VSFG)法を用いることで非蛍光性試料にも広く適用できる赤外超解像顕微鏡を開発し、非染色のタマネギ根毛細胞に適用した。その結果を Fig.1 に示す。

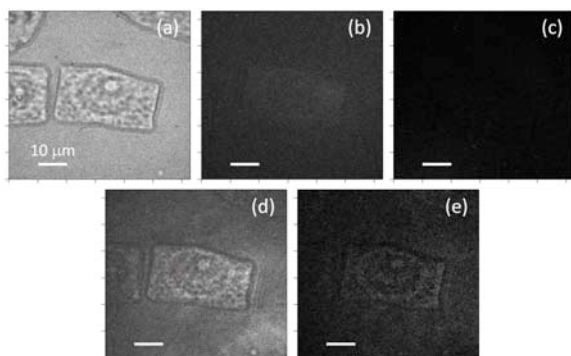


Fig.1 タマネギの根毛細胞の VSFG イメージング

(a)はタマネギ根毛細胞の透過像である。この細胞に VSFG 赤外超解像顕微鏡法を適用したところ、(b)可視レーザー(610 nm)のみ、(c)赤外レーザー(2880 cm^{-1} (3472 nm))のみを入射した場合は、殆ど発光は観測されない。しかし、両者を同時に入射した(d)では細胞全体から強い発光が観測された。赤外レーザーの波長を 2703 cm^{-1} (3700 nm)に変えた(e)では発光強度が著し

く低下した。つまり、この発光は細胞内の分子の赤外吸収に関する情報を反映していることが示された。

さらに、空間分解能を見積もったところ 1.1 μm であった。これは、測定時の赤外光に対する回折限界(約 4 μm)を遥かに凌駕した赤外超解像であり、細胞内の部分構造の赤外分光イメージングが可能であることを Fig. 1 の結果は示している。なお、この測定では、可視・赤外レーザー光のスポット径を約 100 μm と少し大きめにして試料全体に照射し、生じる VSFG 光を背面から対物レンズで検出する非走査型光学系を採用し、赤外イメージングを行った。

次に、赤外波長を変化させ、細胞内の各部位における VSFG 信号の強度を波長(振動数)に対してプロットしたところ、Fig.2 に示す赤外スペクトルが得られた。

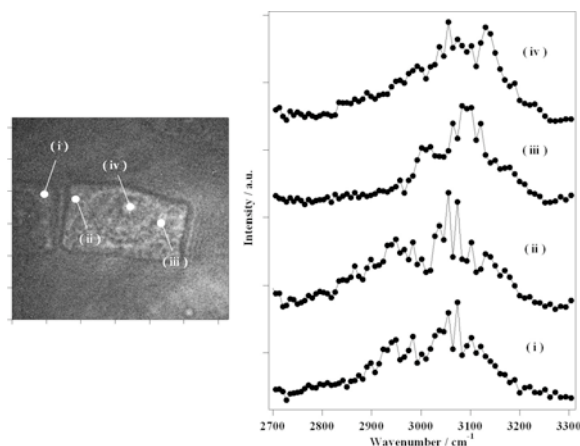


Fig.2 細胞内の各点における赤外スペクトル

(i)と(ii)は異なる細胞の細胞質部分であり、どちらも 2900-3000 cm^{-1} に他の領域と比べて強い信号が見られる。この赤外波長はアルキル鎖の C-H 伸縮振動に相当し、細胞壁に含まれる糖や細胞膜中の脂質分子による吸収を反映していると考えられる。一方、(iii)の核壁や(iv)の核小体部分では、より高波数の 3055-3130 cm^{-1} に芳香環の C-H 伸縮振動に対応する強い信号が観測された。タンパク質や核酸には芳香環が多く含まれているため、これを反映しているものと考えられる。

今回開発した VSFG 赤外超解像顕微鏡により、細胞自身を構成する生体分子の赤外吸収イメージングを行うことが可能となり、今後さらなる応用が期待される。

【引用文献】

- 1) M. Sakai *et al.*, *Chem. Lett.* **36**, 1380-1381 (2007)

業績紹介：アンモニアクラスターの巨大化に伴う結晶型水素結合構造の形成を観測

松本剛昭 (兵庫県大院物質・公募研究代表者)

論文題目: "Crystalline structures in large ammonia clusters studied by IR cavity ringdown spectroscopy and a density functional theory calculation"

著者: Yoshiteru Matsumoto and Kenji Honma

雑誌巻号: *Chem. Phys. Lett.* **490**, 9-13 (2010)

アンモニアは言わずと知れた基本的な分子であり、水と並んで、水素結合ネットワークを研究する上でのプロトタイプである。気・液・固の相を問わず、振動分光や粒子線散乱などによりその構造が研究されてきた。アンモニア分子の水素結合サイトは4つ(NH基3つと非共有電子対)なので、直観的には4配位型水素結合によるネットワーク形成が期待される。ところが固体結晶に着目すると、非共有電子対に3つのNH基が

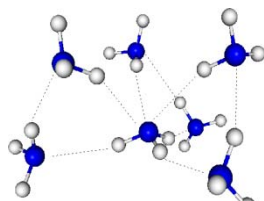


図1. アンモニア結晶の6配位型水素結合

配向する6配位型の水素結合構造(図1)が基本単位であることがX線散乱実験により明らかにされている。近年、凝集系の微視的モデルとして、100量体を超えるような巨大サイズクラスターが注目されている。気相分子から凝集系へ構成分子数のボトムアップを行うことにより、水素結合構造の変遷や、どの凝集系(液体 or 固体)の構造へ収斂するかと言ったテーマで多くの研究が進められている。本研究では、100~700量体の巨大アンモニアクラスターを対象として、サイズの増加に伴う水素結合形成が、結晶の様な配列構造と過冷却液体やアモルファス固体の様な乱雑構造のどちらに近づくのかを解明することを目的とした。

超音速ジェット中に生成した巨大アンモニアクラスターのNH伸縮振動を赤外キャビティリングダウン分光法により観測した。図2に、ジェット冷却時の試料ガスよどみ圧を1~3気圧と変化させて測定した赤外スペクトルを示す。よどみ圧増加は、平均クラスターサイズの増大に相当する。(1気圧で100量体、3気圧で700量体。サイズの決定法については省略。)スペクトルには3215、3260、3380 cm^{-1} にバンドが観測され、固体アンモニアとの比較により、各々NH縮重変角の倍音($2\nu_4$)、NH対称伸縮(ν_1)、NH縮重伸縮(ν_3)と

帰属された。ここで ν_3 バンドに注目すると、クラスターサイズの増加に伴い、バンド幅の狭帯化(38 cm^{-1} @ 1気圧 \rightarrow 17 cm^{-1} @ 3気圧)が見られた。この狭帯化を解析するために、図1に示した結晶型水素結合を拡張させたモデルクラスターを構築して、それらの ν_3 振動の計算を行った。その結果を図3に示す。

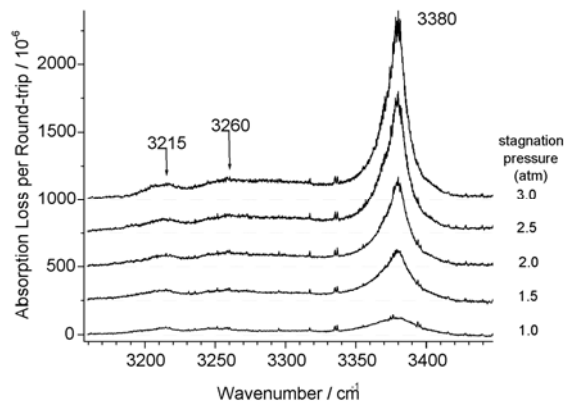


図2. アンモニアクラスターの赤外スペクトル

帰属された。ここで ν_3 バンドに注目すると、クラスターサイズの増加に伴い、バンド幅の狭帯化(38 cm^{-1} @ 1気圧 \rightarrow 17 cm^{-1} @ 3気圧)が見られた。この狭帯化を解析するために、図1に示した結晶型水素結合を拡張させたモデルクラスターを構築して、それらの ν_3 振動の計算を行った。その結果を図3に示す。

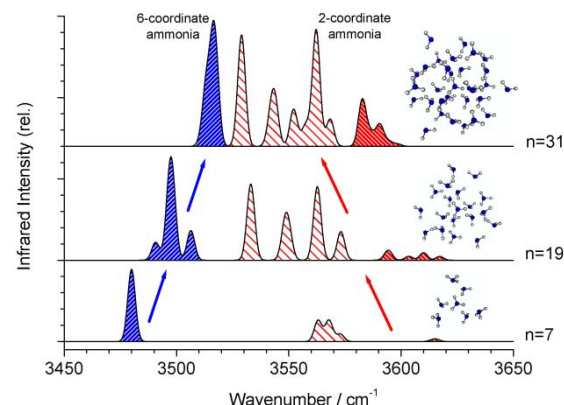


図3. 結晶モデルクラスターの ν_3 振動(B3LYP/6-31+G(d, p)で計算)

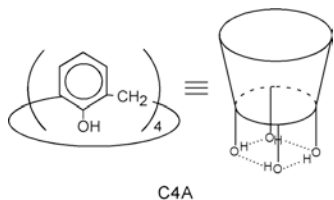
モデルクラスターの ν_3 は①6配位型、②2配位水素結合型、③2配位ダングリング型の3つに分類され、サイズ増加に伴い6配位型は高波数側に、2配位型は低波数側に振動数シフトする。この振る舞いは、全 ν_3 振動が一定周波数に収斂し、バンド幅が狭くなることを示しており、上述した実験結果を再現している。従って、アンモニアクラスターは巨大化の過程で、結晶に類似した水素結合構造を形成していくと結論した。

業績紹介：カリックス[4]アレン包接化合物の超音速ジェットレーザー分光

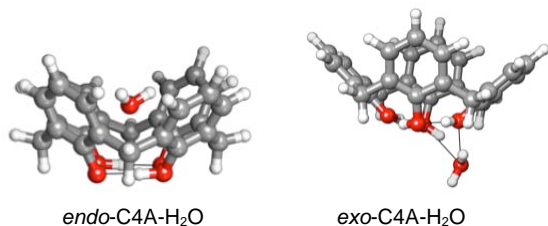
江幡孝之 (広大院理・公募班 A01 研究代表者)
論文題目：1."The structure of the Calix[4]arene-(H₂O) cluster, world's smallest cup of water", 著者：N. Hontama, Y. Inokuchi, T. Ebata*, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, and S. S. Xantheas*,
雑誌巻号：J. Phys. Chem. A. 114(9), 2967–2972(2010)

2. "Encapsulation of Ar_n complexes by calix[4]arene: *endo*- vs. *exo*-complexes", 著者：T. Ebata*, N. Hontama, Y. Inokuchi, T. Haino, E. Aprà and S. S. Xantheas*,
雑誌巻号：Phys. Chem. Chem. Phys., 2010, 12, 4569 – 4579

上記 2 報の論文は、カリックス[4]アレン(C4A)に種々の希ガスや水分子をゲストとした包接化合物を超音速分子線中に生成し、その包接構造や包接のメカニズムについて研究した論文である。C4A は 4 つのフェノール分子がメチレン基を通じて結合し、それぞれの水酸基が水素結合しているために全体でカップ(盃)の形をしている。

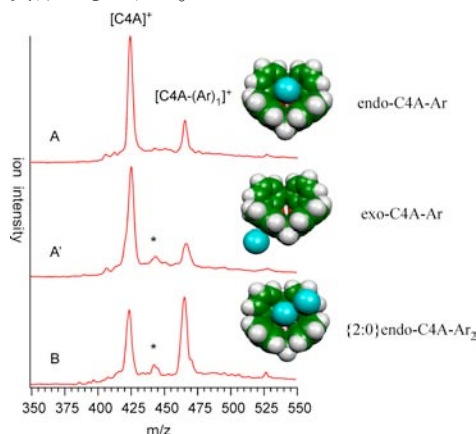


これまでの凝集相の研究から、疎水性の分子は分散力や CH—π 相互作用で盃の内側に内包され、NH や水酸基を持つ分子は、C4A の水酸基に外側から水素結合すると予想されていた。そこで論文 1 では、C4A-H₂O 水和錯体を超音速分子線中に形成し、電子スペクトルや赤外-紫外二重共鳴スペクトルを観測した。また、Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) の Xantheas 氏との共同研究により MP2 レベルの計算を行い実験結果と比較した。その結果、*endo*-C4A-H₂O 構造が



exo-C4A-H₂O 構造よりも 1120 cm⁻¹ 安定で、また観測した赤外スペクトルが、*endo*-C4A-H₂O 構造で予

想されるものと良い一致を見せた。このことから、C4A-H₂O 錯体の構造は初期に予想された外接(*exo*)型ではなく、双極子-双極子相互作用により内包(*endo*)型をとることが明らかになった。また内包エネルギーを実験的に 3140 cm⁻¹ と求めた。一方論文 2 では、C4A-Ar_n 錯体の構造について研究を行った。C4A-Ar_n の電子スペクトルは、我々が以前発表しているが¹⁾、構造を決定するにはいたっていない。特に、(1)内包エネルギーの大きさはどのくらいか、(2)n≥2 以上の錯体がどのような構造であるかについて興味をもたれた。



実験は、超音速分子線中に生成した C4A-Ar_n 錯体の質量スペクトル、電子スペクトルや赤外解離スペクトルを観測した。得られた結果を CCSD レベルの量子化学計算で予想される構造、安定化エネルギー、結合エネルギーと比較することで構造決定を行った。その結果、C4A-Ar₁ について CCSD 計算で、*endo*-、*exo*-型がそれぞれ 1500 cm⁻¹、510 cm⁻¹ の結合エネルギーを持ち、*endo*-型がより安定であることが分かった。実験においても *endo*-型、*exo*-型の両異性体を観測し、計算結果を support する結果を得た。C4A-Ar₂ では、計算は {2:0}型と {1:1}型の両 isomer がほぼ同じ結合エネルギーを持つ結果となったが、電子スペクトルのシフト値から観測したのは {2:0}型と結論した。さらに大きな C4A-Ar_n は Ar_n が C4A に内包された {n:0}型が安定な構造であると予測した。これらの結果から、C4A のゲスト分子を内包する高い能力を検証することができた。これらの結果は、今後他のゲスト分子の包接構造を研究する上で指針となるものと考えている。

参考文献：1) T. Ebata, Y. Hodono, T. Ito, and Y. Inokuchi, *J. Chem. Phys.*, 126, 141101 (2007)

業績紹介：アミノ酸置換で反応生成物のキラリティを反転できる酵素の立体構造

中迫雅由（慶應大・公募班 A03 研究代表者）

論文題目：“Structural basis for inverting the enantioselectivity of arylmalonate decarboxylase revealed by the structural analysis of the Gly74Cys/Cys188Ser mutant in the liganded form”

著者：Rika Obata and Masayoshi Nakasako

雑誌巻号：Biochemistry, 49, 1963-1969 (2010)

溶液中の多くの化学反応では、生成物のキラリティを制御することは難しい。しかし、金属錯体や反応中間状態立体構造を制御可能な錯体や触媒化合物が発明され、生成物のキラリティを選択的に制御できるようになってきた。酵素タンパク質では、元々反応場がキラリティを有しているため、生成物のキラリティが選択的に制御されている。一方、酵素を利用した工業生産等では、生成物のキラリティを人為的に操作可能な酵素の変異体を作成する試みがなされている。幾つかの方法論が提示されているが、数多くの変異体の立体構造解析と酵素反応解析の蓄積が不可欠な状況にある。

今回、立体構造を解析したのは、そのような工業生産利用の候補として挙げられているアシルマロン酸脱炭酸酵素(Arylmalonate decarboxylase; AMDase)である。AMDase は、240 個のアミノ酸残基から成り、エナンチオ選択的脱炭酸反応とエナンチオ選択的プロトン化の 2 段階反応を行う (図 1)。これまでの研究から、活性中心に存在する Gly74 および Cys188 の変異によって、第二段階の反応が影響を受け、得られる生成物のキラリティが変化することが知られていた。

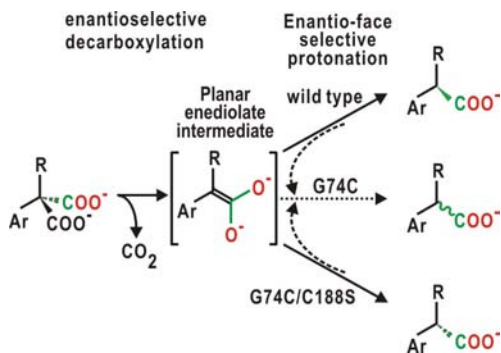


図 1. AMDase 野生型および変異体の触媒反応

まず、重原子多重同型置換解析によって得られた野

生型の X 線結晶構造から、同酵素が、N 末端側と C 末端側のドメインで形成され (図 2)、その間に形成されたクレフトに活性部位が存在することが示された。

さらに、ラセマーゼ活性をもつ Gly74Cys 変異体と、生成物の構造が野生型とは鏡像となる二重変異体 (Gly74Cys/Cys188Ser) (図 1) の結晶構造解析を行った。Gly74Cys/Cys188Ser 二重変異体では、平面構造を有すると予想されている反応中間状態に極めて近い構造で、リガンド分子が活性部位に結合していた (図 2、3)。得られた 3 つの立体構造に基づいて、酵素の反応機構を予測し、Gly74Cys 変異や二重変異による生成物キラリティ制御の仕組みを明らかにした。今回の構造解析は、アミノ酸置換によって反応生成物のキラリティを制御する際の指針の一つを提供するものである。

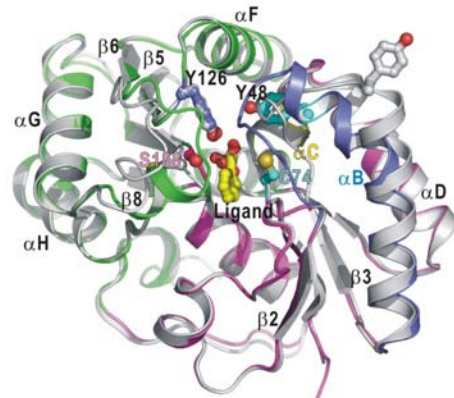


図 2. AMDase 二重変異体 (緑、紫、青) と野生型の立体構造モデル (灰色)。リガンド結合によって αB が活性クレフトを覆って脱炭酸に適した反応場が形成される。

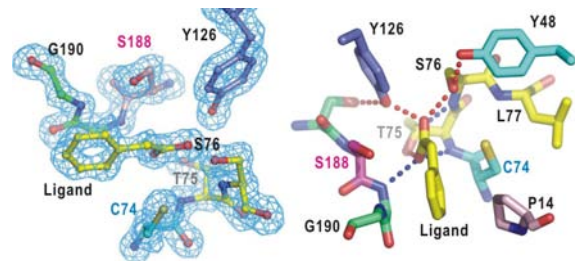


図 3. 左) 活性クレフト内の電子密度図と右) リガンドタンパク質間の相互作用の模式図。リガンド α 炭素を挟むように Ser188 と Cys74 側鎖が配置されており、Cys74 から選択的にプロトンが α 炭素に渡されて、野生型とは鏡像関係となる生成物が得られると推定された。

業績紹介：経験的水和水分布関数を用いた蛋白質極性原子周辺の水和構造予測

中迫雅由（慶應大・公募班 A03 研究代表者）

論文題目："Prediction of Hydration Structures around Hydrophilic Surfaces of Proteins by Using the Empirical Hydration Distribution Functions from a Database Analysis."

著者：Daisuke Matsuoka and Masayoshi Nakasako

雑誌巻号：J. Phys. Chem. B, **114**, 4652-4663 (2010)

蛋白質表面近傍に位置する水和水分子は蛋白質の機能や安定性に必要不可欠であると考えられている。蛋白質分子表面に吸着した水分子位置は、主に高分解能低温下 X 線結晶解析により同定されるが、低分解能構造モデルのみしか得られない場合やホモロジーモデリングによって推定されたモデルなど、その水和構造が分からないケースも少なくない。そのような場合でも、その立体構造から水和水構造が予測することができれば、その蛋白質の機能や安定性に対して水分子が果たす役割を議論する際に大変役立つと期待される。

我々はデータベース解析により得られた極性原子周辺の経験的水和水分布関数[1]を足し合わせていくことにより、蛋白質表面の溶媒接触可能な極性原子周辺や内部空隙の水和水分子分布関数を計算し、予測水和水密度として提示するプログラムを開発した。

この論文では、作成したプログラムを生化学・生物物理学的に興味のある蛋白質に対して適用し、蛋白質-蛋白質境界面の水和水構造や、蛋白質の構造変化に伴う水和水変化についての予測結果を報告した。図 1, 2 には光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシンに対する予測水和水密度を示した。バクテリオロドプシンには、膜貫通領域内にプロトンポンプ機能に不可欠とされる水和水クラスターが存在する。まず、得られた予測水和水密度が、高分解能 X 線結晶解析で決定された水分子を包含することを確認し、機能に直接関わる反応中間状態について予測を行った。図 1 左には trans BR 状態、右には Late M 中間状態に対する予測結果を示してある。両者を比較すると R82 の向きの変化などにより、水和水クラスターの形状が変化している様子が見て取れる。特に trans BR 状態では細胞質外と分断されていた下側のクラスターは、Late M 中間状態では Ser193 の向きが変化することにより細胞質外へとつながっている。この結果は、Ser193 がバクテリオロドプシンの

プロトン伝達経路のゲートの働きをする、という FTIR 実験からの提案[2]との関連が示唆された。

また本プログラムは極性原子周辺の水和水構造のみを予測することから、膜蛋白質のどの領域が膜に埋まっているのかを推測することも可能となっている(図 2)。

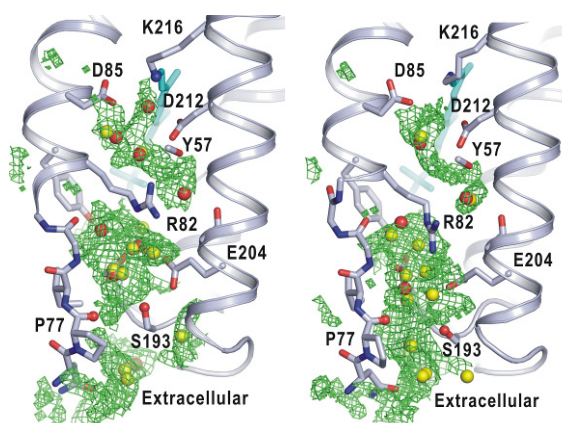


図 1. バクテリオロドプシン (左: trans BR 状態、右: Late M 中間状態)の膜貫通領域内の水和水クラスターに対する予測結果。緑色のメッシュは予測水和水密度、黄球は予測水和水位置とした予測水和水密度の極大位置を示す。赤球は X 線結晶解析により決定された水分子位置を示す。

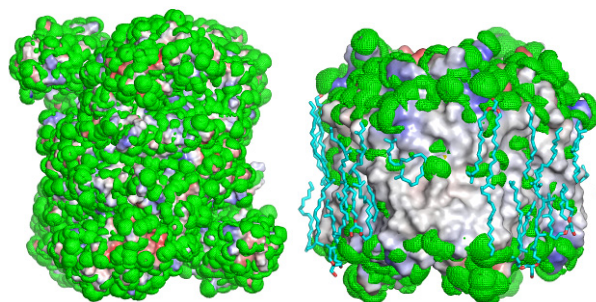


図 2. 左) 水溶性蛋白質であるグルタミン酸脱水素酵素表面に対する予測結果。表面全体に予測水和水密度が表れている。右) バクテリオロドプシン表面での予測結果。その疎水性表面にはほとんど予測水和水密度が現れていない。また脂質分子を Stick model で表している。

引用文献

- [1] D. Matsuoka & M. Nakasako, *J. Phys. Chem. B* (2009) **113**, 11274 – 11292.
[2] S. Wolf, E. Freier & K. Gerwert, *ChemPhysChem* (2008) **9**, 2772 – 2778.