

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18550012  
 研究課題名（和文） マイクロ波分光法による生体関連分子マイクロ水和クラスターの構造と内部運動の研究  
 研究課題名（英文） Studies on the structure and internal-motion of the micro-hydrated clusters of bio-related molecules by microwave spectroscopy.  
 研究代表者  
 藤竹 正晴（FUJITAKE MASAHARU）  
 金沢大学・数物科学系・准教授  
 研究者番号：40212188

研究成果の概要：生体分子のモデル分子とみなされるペプチド分子類および乳酸メチルに、一つ以上の水分子が水素結合したマイクロ水和クラスターの純回転スペクトルを観測し、その解析から分子構造や分子内運動の性質に関する情報を導き出した。種々の 1:1、1:2 クラスターのアイソマーを測定し、その構造や性質の変化を比較調査することにより、水素結合の形成が溶質分子を柔軟にしたり逆に硬くしたりするということを実験的に明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	420,000	3,920,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：分子分光，分子構造，生体関連分子，水素結合錯体，分子内大振幅振動

## 1. 研究開始当初の背景

水溶液中での構造変化とエネルギー移動によってその機能を発現しているといわれている生体分子では、水分子を含めた分子内および分子間の水素結合形成が機能発現に大切な役割を果たすと考えられている。また、生体分子に限らず、分子の溶液中でのふるまいや、孤立した状態から溶媒和により溶けた状態へと移っていく過程、さらには溶媒による化学反応促進機構等を明らかにするためには、溶質分子の性質と溶質-溶媒間相互作用をより詳しく理解する必要がある。マイクロ

溶媒和クラスターは、このような問題を分子論的側面から探求していくために最適なモデル分子系であり、その重要性は早くから注目され、実験・理論の両分野で研究が盛んに行われていた。しかし、水分子が二つ以上結合したクラスターの基底状態に関する精密分光研究となると、その数は意外に少ないという状況であった。一方で、近年、超音速ジェット分光法によるアミノ酸や核酸塩基等の生体関連分子とその水素結合錯体のコンフォメーション安定性や光化学反応の研究が、国内外を問わず盛んに行われるようになっており、高分解能分光法による生体分子の

機能解明を目指した基礎研究は、今後大きく発展してゆくものと予測されていた。

高分解能分光研究の実験手法である赤外スペクトルは強力なツールであるが、振動バンドの帰属は量子化学計算に頼るところが非常に大きく、構造の特定は間接的で詳しい構造の決定は不可能であった。X線回折等は分子構造の決定に有効であるが、複数のアイソマーが共存する場合その解析は容易ではなく、分子内運動に関する情報を導き出すことはさらに難しい。

マイクロ波分光法による純回転スペクトルの研究は、分子構造の決定やクラスター内の水素結合の性質、および分子内大振幅運動等の動的挙動を実験的に明らかできる可能性を持つ、非常に有効な手段であると考えられる。この方法により詳細で新しい情報が実験的に得られることで、理論・シミュレーション研究に対しても比較・検証できる信頼性の高い実験データを供与できるなど、その意義はきわめて大きい。このような事情から、「マイクロ波分光法による生体関連分子マイクロ水和クラスターの構造と内部運動の研究」を計画した。

ペプチド分子はペプチド鎖の基本部品とみなされ、まさに生体関連分子の代表的なモデル分子である。その性質を分子構造論的にきちんと理解することは重要で、そのような立場から、幾つかの基本的なペプチド分子の純回転スペクトルの研究は行われていた。しかしながら、そのマイクロ水和クラスターの回転スペクトルによる研究は、フォルムアミドのみが報告されていただけであった。フォルムアミドにはペプチド鎖の構造変化を理解する上で重要となる内部回転運動が存在しない。そこで、ペプチド基に複数のメチル基の結合したペプチド分子を選び、そのマイクロ水和クラスターの純回転スペクトルの観測と解析を行い、水和によるメチル基内部回転障壁の変化を調査することを考えた。更に、生体分子の構造や機能発現を考える上で重要な鍵を握るとされる、分子内水素結合と分子間水素結合の競争と協調に関する基礎的な理解を深める目的で、乳酸メチルの水和クラスターの研究も重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

有機分子、特に生体関連分子のマイクロ水和クラスターの配位構造や水素結合力、更に内部回転などの分子内大振幅振動運動等の性質を、純回転スペクトルの観測と解析により精密に調査する。配位数や、配位構造の違う水和クラスター間で種々の性質を比較し、類似した溶質分子の場合での違いを議論することで、規則性や特徴を見つけ出し、水素結

合およびそのネットワークの形成が、分子の水溶液中での性質をどのように変化させていくのかを明らかにすることを目的とする。分子内大振幅振動は、室温で容易に起こる生体分子の構造変化を考える上で重要であり、そのポテンシャル障壁が水素結合の形成でどのように変化するかを実験的に求めることで、水和が巨大分子の高次構造形成や機能発現にどのような役割を果たすのかということに関する基礎的な知見を得ようと考えた。幾つかのペプチド分子と乳酸メチルをモデル分子として、錯体構造や水和による性質の変化を詳細に調査する。

## 3. 研究の方法

超音速ノズルジェットにより極低温孤立気相状態を形成し、結合力の弱い水素結合錯体—マイクロ水和クラスターを安定に生成させて、高感度・高分解能測定が可能となるフーリエ変換マイクロ波分光計を用いて純回転スペクトルの観測を行う（図1）。

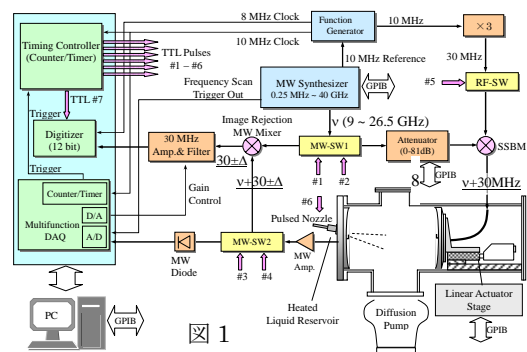


図 1

測定した純回転遷移の帰属と解析を行い、マイクロ水和クラスターの回転定数や分子内大振幅振動のポテンシャル等を精密に決定する。種々の配位数や配位構造のクラスターが同時に観測されると予想されるが、高い分解能によりそれぞれは明確に分離して観測することができる。可能な限り多くの種類のクラスターの観測を実現するために、超音速ノズルの改良・開発を行う。

観測したマイクロ水和クラスターの構造や配位数等を同定するために、量子化学計算を行って種々の水和クラスターの最適化構造を予想し、得られた回転定数を実験値と比較する。必要に応じて同位体置換分子種の測定を行い、詳細な構造の決定を目指す。また、メチル基の内部回転分裂が観測される分子では、解析から内部回転軸の分子内での方向が求まるため、その情報も構造決定に利用する。溶質分子の純回転スペクトルの報告がない場合は、溶質分子自体の研究も行う。また、水の類似分子とみなせるメタノールとの錯

体や異種の溶質分子間錯体の研究も行い、水和クラスターの理解に役立てる。

具体的な分子としては、*N-tert*-ブチルホルムアミド、*N,N*-ジメチルアセトアミド、*N*-メチルアセトアミド等のペプチド分子の水和クラスターの観測を行う。これら一連のペプチド分子の水和錯体の構造を明らかにする。更に、複数のメチル基を有する *N,N*-ジメチルアセトアミドと *N*-メチルアセトアミドでは内部回転ポテンシャル障壁の水和による変化を調査するとともに、メチル基-メチル基ポテンシャル相互作用項の決定を行い、ペプチド鎖の構造変化における情報伝達機構の存在について実験的な検証を行う。

更に、キラル分子でありかつ分子内水素結合を有する乳酸メチルのマイクロ水和錯体の研究も行う。この水和錯体の場合、特に分子内水素結合と分子間水素結合の競争と協調の問題について重点をおき調査する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ペプチド分子マイクロ水和クラスターとその関連分子錯体の研究

###### (a) *N-tert*-ブチルホルムアミド (NtBF) - 水錯体、及び -メタノール錯体

NtBF-水錯体では、1 : 1 錯体のアイソマー2種と、1 : 2 錯体1種の観測に成功した。1 : 1 錯体では HDO, D<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 等の同位体置換水分子錯体の測定も行い、回転定数を用いて NtBF と水の構造は変化しないものと仮定することにより水素結合に関する構造パラメータを実験的に決定した。決定した構造を図2に示す。観測されたスペクトル線の強度から、二つのアイソマーの安定性に大きな差は無いが、左側のアイソマーの方がより安定であるとわかった。

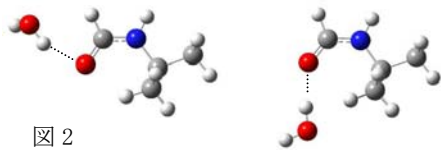


図2

1 : 2 錯体は、図3のような水ダイマーが NtBF の CHO 部分に結合して環状の水素結合ネットワークを形成していることがわかった。

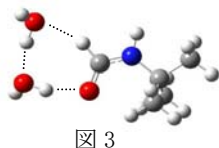


図3

また、NTBF-メタノール1 : 1 錯体2種の測定も行い、図2の水錯体と類似した構造をしていることを明らかにした。内部回転分裂の解析から求めたメタノール内のメチル基の内部回転障壁の高さ  $V_3$  の値は、ど

ちらのアイソマーにおいてもメタノール単体の値の6割程度に小さくなっていた。このことは、メタノールが錯体分子内で大きく揺らいでいることを意味しており、水錯体でも同様なことが起きているものと推測される。

ペプチド分子内の N 原子の核四重極子結合定数の変化から、水素結合の形成がペプチド C-N 結合の二重結合性を増加するということが推測された。この傾向は、C=O への配位方向に依存せず、また水・メタノールの違いにも関係しないことがわかった。

###### (b) *N-tert*-ブチルホルムアミド (NtBF) - フォルムアミド (FA) 錯体

ペプチド分子間錯体である NtBF-FA の観測を行った。観測された錯体の構造は、図4に示した構造

であった。<sup>15</sup>N-FA 同位体置換分子種の測定も行い、水素結合構造を決定した。また N

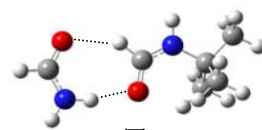


図4

原子の核四重極子結合定数の変化について議論を行った。

###### (c) *N,N*-ジメチルアセトアミド (NNDMA) - 水錯体

1 : 1 錯体を1種類帰属した。その配位構造は、図5に示すように C=O 部分に水が結合したものであった。NNDMA は分子内の3つのメチル基が内部回転運動による分裂を起こしている。その解析から、水分子が配位することにより、全てのメチル基で内部回転障壁が低くなるということが判明した。このことは、ペプチド鎖からなるタンパク質の高次構造形成において、水分子が糊の役割だけではなくペプチド鎖の柔軟さを助長していることを意味していると考えられる。この分子の場合も核四重極子結合定数の変化から C-N 結合の二重結合性の増加が予想され、内部回転障壁の低下と関係していると思われる。

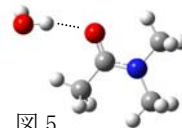


図5

###### (d) *N*-メチルアセトアミド (NMA) - 水錯体

*N*-メチルアセトアミド-水錯体の観測を行い、配位構造を特定するとともに、メチル基内部回転ポテンシャルの決定を行った。観測された錯体の構造は図6のようなものであり、NNDMA-水と同様な配位構造であった。内部回転分裂の

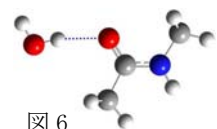


図6

解析から、分子内の二つのメチル基の内部回転障壁  $V_3$  はどちらの約  $92 \text{ cm}^{-1}$  となり、水分子の配位によりどちらも 1 割程度高くなることが解った。これは、類似分子の NNDMA の場合とは逆の傾向であり意外な結果であった。一方、N 原子の核四重極子結合定数の変化は、他のペプチド分子系と同様、C-N 結合の二重結合性の増加を示唆していた。更に、NMA モノマーでは小さかった全内部回転ポテンシャル関数のメチル基-メチル基相互作用項も水錯体では顕著な値となり、二つのメチル基の運動が相互に影響し合っていることが明らかになった。このことは、ペプチド鎖の構造変化の情報伝達が水和により促進されるという可能性を示唆しており、極めて興味深い発見であった。

以上の一連の実験結果から、ペプチド分子水和錯体は次のような特徴を持つと考えられる。①ペプチド基の C=O がプロトンアクセプターとして働く方が N-H がプロトンドナーとして働くよりも安定な錯体を形成しやすい。②その際、N-C=O...H の部分の構造は、トランス的な配位構造の方が有利であるが、シス型との大きな差はない。遠心力歪定数から水素結合の力の定数を見積もった結果、③プロトンドナーとしては水とメタノールの O-H 基であっても、ペプチド N-H 基であっても同程度の水素結合合力である。④2 個の水分子が水素結合する場合は、環状のものが安定である。⑤N 原子の核四重極子結合定数の絶対値は水素結合の形成により小さくなるが、それはペプチドの C-N 結合の 2 重結合性の増加と関係がある。⑥C=O への水素結合の形成(水の付加)は、ペプチド結合に付いているメチル基の内部回転ポテンシャル  $V_3$  を変化させる。⑦NNDMA と NMA での  $V_3$  の変化傾向の違いから、水和による  $V_3$  の変化の原因は、C-N 結合の 2 重結合性の増加だけでは説明できず、別の要因も考えなければならない。⑧一方、NMA での結果から、水素結合の形成は、ペプチド鎖でのねじれ構造変化の情報を一方の端から他方へと伝える機能を助長する可能性がある。

## (2) 分子内水素結合と分子間水素結合が共存するマイクロ水和クラスターの研究

### (a) 乳酸メチル(ML)-水及び ML-メタノール 1 : 1 錯体

生体分子のモデルとされる乳酸メチルの水錯体の観測を行い、3 種類の 1 : 1 錯体の帰属と解析を行った。乳酸メチルの構造は、ねじれに対する柔軟性を持っているが、 $-C=O...H-O-$ 型の分子内水素結合を形成することで安定化する。観測した錯

体のうち、2 つは、その分子内水素結合の間に入り込んで環状の水素結合ネットワークを形成し、乳酸メチル自体の構造を大きく変化させるものであった(図 7)。この二つの挿入型錯体 (In(Me) と In(H)) は、乳酸メチルが分子キラリティを持つために生

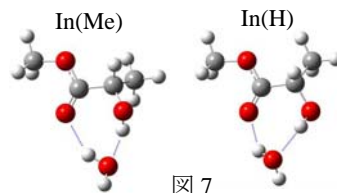


図 7

じる異性体であり、分子キラリティ認識のメカニズムの理解につながる。残りの一つは乳酸メチルの分子内水素結合を保持したまま水分子が単純に付加するタイプ (Ad(OH))

(図 8) であることがわかった。帰属した全ての錯体のスペクトルには、ML の O-Me 基内部回転による分裂が観

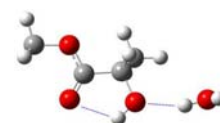


図 8

測され、その解析から  $V_3$  の値を決定した。また、In(H)では、 $C^*-Me$  の内部回転も観測され、その  $V_3$  も求めることができた。また、Ad(OH)では、水分子内のプロトン交換大振幅運動によるものと思われる分裂も観測され、錯体内で水が水素結合を一旦切って再び結合するというような激しい運動をしていることが解った。重水素置換水分子を用いた実験も行い、挿入型錯体に関しては水素結合に関与していない水分子内の水素原子のコンフォメーションを決定した。

超音速ビーム中での存在量を、観測されたスペクトル線の強度比から見積もると、1 : 1 錯体では  $In(Me) > Ad(OH) > In(H)$  となっていることがわかった。これは、量子化学計算による各錯体のエネルギー差に基づく熱力学的考察だけでは説明できないものであった。そこで、錯体の生成過程について動力学的要因を踏まえた次の様な考察を行った。挿入型では ML 自身の構造が大きく変化するため、構造歪による不安定化が起こり、活性化エネルギー障壁を与える可能性があるが、環状の水素結合ネットワークの形成による安定化が大きいいため、実際の錯体形成過程において活性化エネルギー障壁が存在するとは限らない。一方付加型では、活性化エネルギーを必要としないためエネルギー的(熱力学的)には不利であるが、かなりの量生成している可能性がある。これを理論計算で予測することは難しいが、今回の実験結果を説明するためには、挿入型錯体の形成には若干の活性化エネルギーが必要であると考えべきであることがわかった。

また、決定した O-Me 基の  $V_3$  の値を、ML モノマーと各錯体で比べたところ、付加

型では殆ど変化しなかったのに対し、挿入型では5~10%程度上昇することがわかった。これは、ML自身の構造変化と関係しているものと考えられる。

更にメタノールとの1:1錯体の観測を試み、水錯体In(Me)型と同じタイプのアイソマーを検出した。MLのO-Me基とメタノールのメチル基の内部回転障壁を決定した。O-Me基の $V_3$ は水錯体と同程度増加していた。一方メタノールのメチル基では大きな低下を示したが、これからメタノール分子が錯体内で大きく揺らいでいることが解った。1:1錯体では、水とメタノールのMLに与える効果は殆ど同じであるということが実験的に示された。

### (b) 乳酸メチル(ML)ー水 1:2 錯体

次いで1:2錯体の観測を試み、図9のような2種類の水ダイマー挿入型錯体を発見した。構造の特定は、解析により得られる回転定数

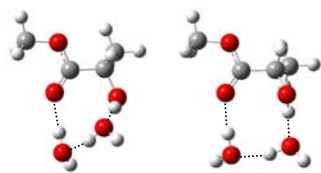


図9

やメチル基内部回転軸の分子内慣性主軸への方向余弦を、量子化学計算の結果と比較することにより行った。非常に多くの可能な錯体構造が予想されたが、現在実験と最も良い一致を示すものは図に示したように、MLのO=C-C\*-O-H部分と2個の水からなる9員環構造の2種類であった。どちらのアイソマーにも、O-Me基の $V_3$ 値の上昇が見られ(1:1挿入型水錯体と同程度)、挿入型の特徴と考えれば納得できる。しかし、1:1錯体の場合には挿入型で観測されず付加型でのみ観測された水分子内のプロトン交換運動の存在を示唆する分裂が、どちらの1:2アイソマーでも観測されている。仮に、一つの水分子内でのプロトン交換で説明しようとする、錯体内の2個の水分子のどちらなのかという問題が残る。量子化学計算で得られた水素結合距離などを見ても、一方の水の水素結合が弱いという結果は得られない。未だ解明には至っていないが、この事実は、2つ目の水の結合が水錯体に新たな動的性質を与えることを示しているものと考えられ、大変興味深い。

### (3) 気・液パルス混合ノズルの開発とマイクロ溶媒クラスター研究への応用

HDOやD<sub>2</sub>Oとの錯体を観測する場合、従来使用してきたヒートノズルでは、必要な有機分子と水および希ガスをあらかじめ混合しておくため、ペプチド分子のN-Hや乳

酸メチル分子のO-Hの水素原子が容易にD原子に置換してしまい、観測したいD置換分子錯体種のスペクトルが弱くなるという問題があった。また、メタノールとの錯体を観測する場合は、あらかじめ大型のガスタンクにメタノール混合ガスを生成しておかなければならず、長時間の連続測定を難しくしていた。そこで、有機分子と水を別々の電磁弁を用いてパルス放出し、超音速ビームを生成する直前で混合させて真空チャンバー内に噴射させることのできる新しいノズルの開発を行った。実験の容易さも考慮して、有機分子は液体のままでも使用できるよう工夫してある。この気・液パルス混合ノズル(図10)が、重水素置換水分子やメタノール錯体の観測に応用しできることを、幾つかの錯体の研究に応用して有効であることを示し、錯体構造の特定に役立てた。

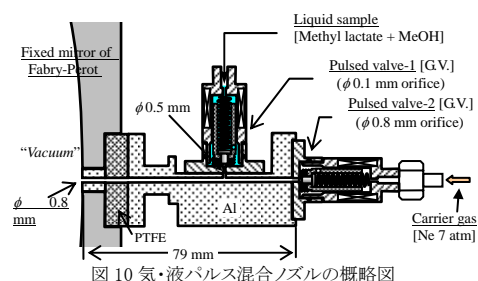


図10 気・液パルス混合ノズルの概略図

ペプチド分子群、乳酸メチルともに、そのマイクロ水和クラスターに関して多くの興味深い実験結果を得ることができた。水和による配位構造や水素結合ネットワークの形成が、溶質分子の性質にどのような変化を与えるかについての基礎的な知見を導くことができたと思われるが、それと同時に、明らかにすべき新しい重要な問題も見えてきた。ペプチド分子では、特に、水和による内部回転障壁の変化の原因として、C-N結合の2重結合性の増加以外の要因を解明する必要があることが明確になった。また、水分子が3個以上結合したクラスターは、残念ながら観測することはできなかった。今後は、研究を更に発展させて、今回解明に至らなかった問題の解決や未観測クラスターの観測を行い、水和と分子の性質の変化について理解をさらに深め、生体分子の高次構造形成や機能発現の解明につながる重要な機構の発見につなげてゆきたい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計17件)

① 藤竹正晴, 乳酸メチルー(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>錯体の分

子構造, 2008 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会, 2008. 11. 29, 福井

② 藤竹正晴, 乳酸メチルーDOH 及び HOD 錯体のフーリエ変換マイクロ波分光, 2008 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会, 2008. 11. 29, 福井

③ 藤竹正晴, 乳酸メチルー<sup>13</sup>C 同位体分子の純回転スペクトル, 2008 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会, 2008. 11. 29, 福井

④ 藤竹正晴, 乳酸メチルー(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> のフーリエ変換マイクロ波分光, 第 2 回分子科学討論会, 2008. 9. 24, 福岡

⑤ 藤竹正晴, 気液分離噴射型パルスノズルの製作とフーリエ変換マイクロ波分光への応用, 第 2 回分子科学討論会, 2008. 9. 24, 福岡

⑥ 藤竹正晴, N-メチルアセトアミドー水錯体のフーリエ変換マイクロ波分光, 第 2 回分子科学討論会, 2008. 9. 24, 福岡

⑦ 藤竹正晴, 乳酸メチルー水錯体の分子構造と錯体生成過程, 第 2 回分子科学討論会, 2008. 9. 24, 福岡

⑧ 藤竹正晴, N,N-ジメチルアセトアミドー水錯体のフーリエ変換マイクロ波分光, 第 8 回分子分光研究会, 2008. 5. 16, 神戸

⑨ 藤竹正晴, N-tert-ブチルホルムアミドーホルムアミド錯体のフーリエ変換マイクロ波分光, 2007 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会, 2007. 12. 1, 富山

⑩ 藤竹正晴, 乳酸メチルーD<sub>2</sub>O 錯体のフーリエ変換マイクロ波分光, 2007 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会, 2007. 12. 1, 富山

⑪ 藤竹正晴, 付加型 乳酸メチルー水錯体の分子構造の研究, 2007 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会, 2007. 12. 1, 富山

⑫ 藤竹正晴, 付加型 乳酸メチルー水錯体の分子内大振幅振動についての考察, 2007 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会, 2007. 12. 1, 富山

⑬ 藤竹正晴, 乳酸メチルー水錯体のフーリエ変換マイクロ波分光, 第 1 回分子科学討論会, 2007. 9. 19, 仙台

⑭ 藤竹正晴, N,N-ジメチルアセトアミドー水錯体のフーリエ変換マイクロ波分光, 第 7 回分子分光研究会, 2007. 5. 26, 東京

⑮ 藤竹正晴, N-tert-butylformamide-methanol 錯体のフーリエ変換マイクロ波分光, 第 7 回分子分光研究会, 2007. 5. 26, 東京

⑯ 藤竹正晴, N-tert-butylformamide 水和錯体の分子構造, 分子構造総合討論会 2006, 2006. 9. 23, 静岡

⑰ 藤竹正晴, 乳酸メチルのフーリエ変換マイクロ波分光, 分子構造総合討論会 2006, 2006. 9. 23, 静岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤竹 正晴 (FUJITAKE MASAHARU)

金沢大学・数物科学系・准教授

研究者番号: 40212188