

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25708001

研究課題名(和文) 気相分光によるペプチド分子の励起状態ダイナミクス タンパク質の光防御機構

研究課題名(英文) Excited state dynamics of peptides by gas phase spectroscopy - photo protecting mechanism of protein

研究代表者

石内 俊一 (Ishiuchi, Shun-ichi)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：40338257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：芳香族アミノ酸を含む種々のペプチドに対して、レーザー脱離超音速ジェットレーザー分光法を適用し、コンフォメーションを区別した電子及び赤外スペクトルを測定した。理論計算との比較から、各コンフォマーの構造を決定し、構造と電子スペクトルの形状(ブロードか否か)の相関を検討した。チロシンを含むペプチドでは、異なるコンフォメーション間で励起状態寿命に大きな差は見られなかった。一方、トリプトファンを含むペプチドでは、N-H...O=Cの強い環状水素結合を形成しトリプトファン残基がその環に含まれる場合に、ブロードな電子遷移が観測され、このような構造が速い励起状態緩和を促進している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Laser desorption supersonic jet laser spectroscopy was applied to several peptides including aromatic amino-acids to measure conformer-selected electronic and infrared spectra. By comparing them with theoretical calculations, structure of each conformer was determined, and the correlation between the structure and shape of the electronic spectrum (whether broadened or not) was discussed. In the case of the peptides including tyrosine, significant difference of excited state lifetime was not found among different conformers. On the other hand, in the tryptophan-inculded peptides, broadened electronic spectra were observed when the peptides form strong cyclic hydrogen bond between NH and CO and the tryptophan residue is included in that circle. From this result, it was suggested that such structures accelerate excited state relaxation process.

研究分野：分子分光学

キーワード：気相分光 ペプチド 励起状態ダイナミクス レーザー脱離 レーザー分光

1. 研究開始当初の背景

生体関連分子の電子励起状態の緩和過程は、バルクと生体環境中では大きく異なる場合がある。例えば、緑色蛍光タンパク質 (GFP) のチロシン由来の発色団は、タンパク質中では文字通り緑色の蛍光を発するのに対して、水溶液中ではほとんど発光しない。これは、タンパク質中の束縛空間に置かれた発色団が水溶液中とは異なるコンフォメーションを取り、その結果、水溶液中で起こる速い無輻射過程が抑制されるためであると考えられている [1]。また、核酸塩基対の電子励起状態緩和も分子間水素結合構造に強く依存することが気相分光により明らかになっている。気相中では、天然型であるワトソン-クリック構造では速い緩和過程を反映してブロードな電子スペクトルが観測されるのに対して、非ワトソン-クリック構造ではシャープな電子スペクトルが観測される。この速い緩和過程は、 $\pi\pi^*$ 状態から、窒素原子の非共有電子対が関与する $n\pi^*$ 状態を経由して、効率的に基底状態に内部転換するメカニズムで説明されており [2]、電子励起エネルギーを速やかに熱エネルギーに変換していると考えられる。このとき、窒素原子周りの構造変化を伴うため、核酸塩基対の水素結合構造の違いが緩和過程に大きな差をもたらしていると解釈されている。天然に存在するワトソン-クリック型でのみ速い緩和過程が存在するという事実は大変興味深く、実際に DNA の光化学反応の量子収率は著しく小さいことを勘案すると、生物はこの速い緩和過程を DNA の光防御機構として利用している様である。

この様に、生物は分子のコンフォメーションを制御することにより、励起状態ダイナミクスを巧妙にコントロールしている。光防御の観点から考えると、上に挙げた DNA 以外にも、近紫外域に吸収をもつ分子はコンフォメーションの制御による何らかの光防御機構を持っている可能性がある。そこで、本研究では芳香族アミノ酸であるチロシンやトリプトファンを含むタンパク質そのものに注目した。我々のこれまでの測定によると、これら芳香族アミノ酸を含むペプチドはわずかな構造の違いで電子スペクトル大きく異なることが明らかとなっている。図 1 にチロシン (Tyr) と

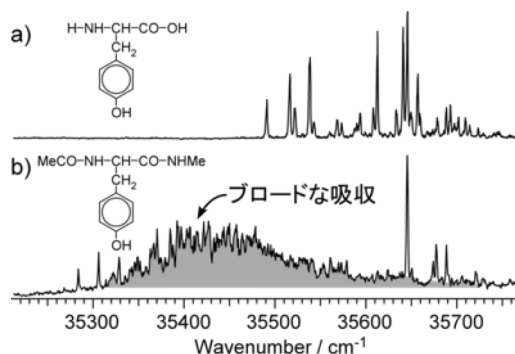


図 1 a) チロシン及び b) キャップチロシンの電子スペクトル

N, C-末端をキャップしたチロシン (Ac-Tyr-NHMe) の電子スペクトルを示すが、チロシンではシャープなバンドが観測されるのに対して、ペプチド結合を有するキャップチロシンではシャープなバンドの他にブロードな吸収が観測され、電子励起状態で速い無輻射緩和或いは大きな構造変化が起きていることが示唆される。キャップチロシンのシャープなバンドは速い緩和過程をもたない異なるコンフォマーの電子遷移であると考えられ、励起状態ダイナミクスはアミノ酸配列やコンフォメーションに強く依存することが示唆される。

このメカニズムを解明するためには、コンフォメーションごとのダイナミクス計測が不可欠であり、コンフォメーションを固定・区別して計測できる気相分光の手法を用いることが最善であると考えられる。コンフォメーションを固定することは揺らぎを止めることに他ならないが、光防御に関する電子緩和はフェムト秒オーダーの現象であり、コンフォメーションの揺らぎ (ナノ~マイクロ秒オーダー) に比べると十分に速いため、分離して議論することが可能である。これまで、欧米を中心として3残基程度の種々のペプチドに対して気相分光の手法を用いてダイナミクスの研究が精力的になされてきたが、スペクトルの S/N が低い、熱分布によるスペクトルのブロードニング等の問題があり、多くの結果の信憑性に問題があることが分かってきた。これらの問題はペプチドの気化法が原因であり、我々は独自のレーザー脱離超音速ジェット法によりこれらの問題を克服している。また、これまで研究されているペプチドはほとんどが市販品に限られており、アミノ酸配列の系統的な研究は一部のペプチドに限られている。我々はペプチド合成も自前でできるため、本研究により初めて系統的な研究が可能になる。

2. 研究の目的

チロシン、トリプトファンを1個含むペプチドを系統的に合成し、レーザー脱離超音速ジェット・レーザー分光法により測定した真空中での電子スペクトルを基に速い緩和過程の有無を検討する。さらに、赤外分光と量子化学計算により各ペプチドのコンフォメーションを決定し、励起状態ダイナミクスと構造の相関を明らかにする。

3. 研究の方法

研究対象となるペプチドは Fmoc 法により固相合成する。粗精製したペプチドを凍結乾燥法により微粉末とする。目的のペプチドが合成できたかは ESI 質量分析より確認した。

レーザー脱離・超音速ジェット法 (図 2) を用いてペプチドを真空中に取り出し、共鳴多光子イオン化 (REMPI) 分光法 (図 3 a) により電子スペクトル (REMPI スペクトル) を測定する。複数のコンフォマーが共存する場合、REMPI スペクトルにはこれらの電子遷移が同

時に観測される。UV-UV ホールバーニング (HB) 分光法 (図 3 b) を用いると単一コンフォマーの電子スペクトルを測定できる。この方法では、 ν_p を特定のコンフォマーの電子遷移に固定し、選択イオン化する。ここに焼き付け光 (ν_B) を照射し波長掃引する。 ν_B が特定コンフォマーを電子励起すると、基底状態の分子数の減少によりイオン量が減少する。従って、単一コンフォマーの電子スペクトルをイオン量の減少として測定できる。

各コンフォマーの構造を決定するために IR dip 分光法 (図 3 c) を用いて赤外スペクトルを測定する。原理は UV-UV ホールバーニング分光法と同じで、 ν_B の替りに波長可変赤外レーザー (ν_{IR}) を用いる。観測された NH 伸縮振動数から何残基先のアミノ酸 C=O 基と水素結合しているかを割り出せる [3]。また、 ^{15}N 同位体置換によりそれぞれの NH 伸縮振動バンドがどのアミノ酸に由来するかを決定できる [4]。以上によりペプチド主鎖の構造が決まる。これに基づいて可能な構造を量子化学計算により網羅的に探索し、理論赤外スペクトルと実測のスペクトルとの比較により詳細なコンフォメーションを決定する。

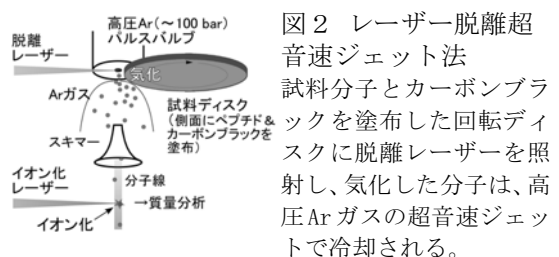


図 2 レーザー脱離超音速ジェット法
試料分子とカーボンブラックを塗布した回転ディスクに脱離レーザーを照射し、気化した分子は、高圧 Ar ガスの超音速ジェットで冷却される。

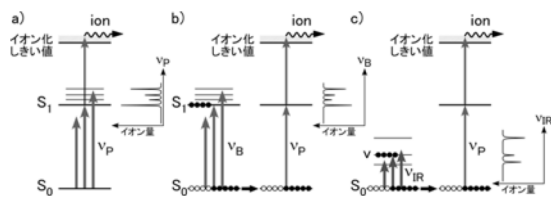


図 3 a) 共鳴多光子イオン化、b) UV-UV ホールバーニング及び c) IR dip 分光法の原理

4. 研究成果

1) チロシンを含むペプチド

上述のキャップチロシン (Ac-Tyr-NHMe) ではブロードな電子遷移を与えるコンフォマーが存在するが、その構造は他のコンフォマーも含めて未解明であった。そこで、まずはこれらを IR dip 分光法及び量子化学計算により明らかにすることにした。

さらに、類似分子であるキャップフェニアラニン (Ac-Phe-NH₂) では 7 員環を形成する N-H...O=C 水素結合 (以下 C₇ と記す) をもつ構造の S₁ 励起状態の寿命が C₅ 構造をもつものに比べて約 50 倍も短いことが報告された [5]。後に理論計算により C₇ 構造の励起状態におけるプロトン移動を伴う電荷移動反応が基底状態への内部転換を加速していることが示唆され、一般的に C₇ 構造が速い緩和過程を持つ可

能性が指摘された [6]。従って、同様のことがチロシンを含むペプチドでも起こるか否かに興味を持たれる。そこで C-末端がアミド化された Ac-Tyr-NH₂ に対しても、電子スペクトル及び赤外スペクトルを測定し、励起状態緩和と構造の関係を明らかにすることにした。

図 4 に Ac-Tyr-NHMe の REMPI スペクトル及び UV-UV HB スペクトルを示す。REMPI スペクトルに観測された各バンドを注意深くプローブすることで 5 本の異なる UV-UV HB スペクトルが観測された。すなわち、Ac-Tyr-NHMe は気相中で 5 つの異なるコンフォメーションをとることが明らかになった。また REMPI スペクトルに観測されたブロードな成分はコンフォマー A, B に由来することが分かった。

REMPI スペクトル中に観測された異なるコンフォマーに由来するバンド A~E に紫外レーザーを固定し IR dip スペクトルを測定した (図 5)。バンドパターンの類似性から 3 つのグループに分けられ、コンフォマー A, B 及び D, E はそれぞれ類似の構造を、またコンフォマー C はそれらとは異なる構造を取ることが予想される。

構造の帰属を行うために、量子化学計算により安定な構造とその理論赤外スペクトルを求め、実測のスペクトルと比較した。量子化学計算によるとペプチド鎖の安定なコンフォメーションとしては C₇ 構造、C₅ 構造及び cis-amide 構造が得られ、この順で不安定化することが分かった。それぞれの構造ではフェノール OH 基の配向の異なる異性体 (回転異性体) が得られ、それぞれの回転異性体間の安定化エネルギーの差は 1 kJ/mol 程度であった。また、回転異性体間では赤外スペクトルは非常に類似しており、図 5 には片方の回転異性体の赤外スペクトルのみを示している。スペク

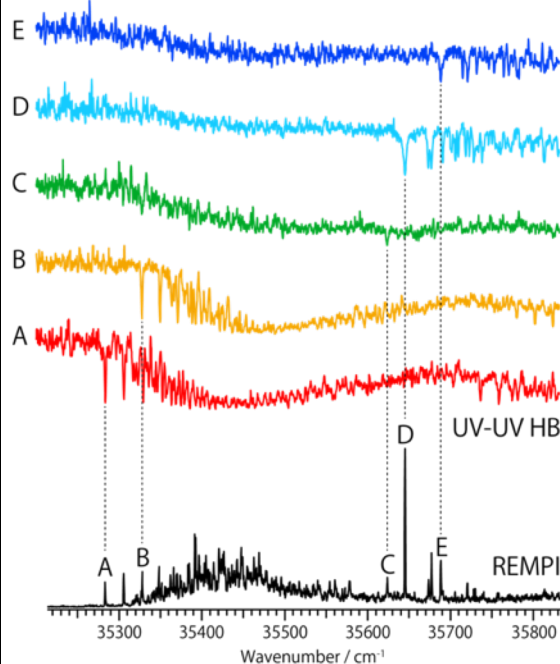


図 4 Ac-Tyr-NHMe の REMPI 及び UV-UV HB スペクトル

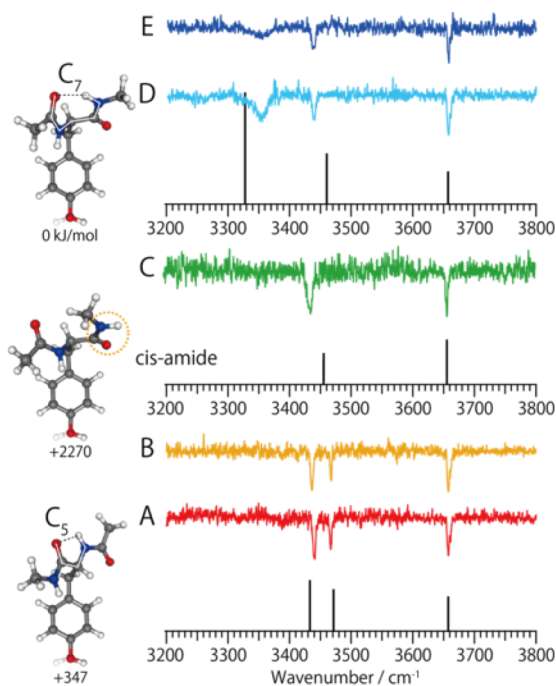


図5 Ac-Tyr-NHMe の理論赤外スペクトルと実測赤外スペクトル (IR dip) との比較

トルパターンはペプチド鎖の構造によって大きく異なり、実測スペクトルとの比較から、コンフォーマーA, BをC₅構造、Cをcis-amide構造、E, DをC₇構造に帰属した。なお、フェノール OH 基の絶対配向については帰属していない。

上述の様に、Ac-Phe-NH₂ の先行研究では C₇ 構造が短い励起状態寿命を示しており、同様のことがチロシンを含むペプチドでも成立するのであれば、C₇ 構造をもつコンフォーマーが S₁ 状態の速い緩和過程を反映してブロードな電子遷移を与えるのではないかと予想した。しかし、ブロードな電子遷移を与えるコンフォーマーA, BはC₅構造をとることが分かり、予想とは異なる結果が得られた。

ブロードな電子遷移の原因は、速い緩和過程の存在だけでなく、電子励起に伴う大きな構造変化により多数の振電バンドに Franck-Condon 因子が分布することで生ずるスペクトルの組み合わせも考えられる。実際に S₁ 状態の構造最適化及び振動計算を行い Franck-Condon スペクトルをシミュレーションしたと

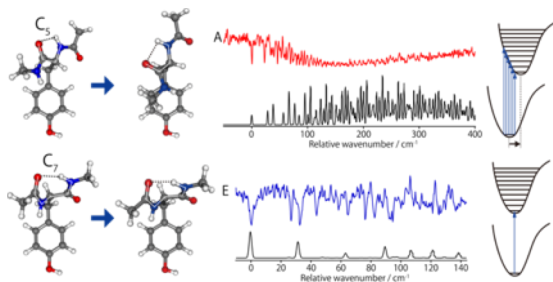


図6 コンフォーマーA, EのFranck-Condon スペクトルシミュレーションと電子励起に伴う構造変化

ころ、コンフォーマーA, Bのブロードな電子遷移はスペクトルの組み合わせで説明できることが示唆された (図6)。フェニルアラニンを含むペプチドではこの様なことは起こらず、なぜチロシンを含むペプチドのC₅構造だけでこの様な構造変化が起こるのかは興味深いが、一方で、励起状態の寿命については実測しないと議論できないことが明らかになった。

そこで、パリ第11大学のP. Çarçabal博士との共同研究でピコ秒ポンププローブ法により各コンフォーマーのS₁寿命を実測することにした。この実験では、ポンプ光に各コンフォーマーの電子遷移エネルギーに固定したピコ秒紫外レーザーを用い、各コンフォーマーをS₁状態に励起し、遅延時間をおいてピコ秒のプローブ光でイオン化した。イオン量をモニターしながら遅延時間を掃引することで、S₁状態の減衰を測定した。結果を図7に示す。なお、コンフォーマーCは信号強度が小さいため測定できなかった。結果としてはどのコンフォーマーでも同様の時間プロファイルが観測され、単一指数関数によるフィッティングによりS₁状態の寿命を求めたところ、コンフォーマーEは若干長いものの、概ねどのコンフォーマーも1 ns程度であり、ブロードな電子遷移を与えるコンフォーマーA, Bが特に短寿命であるということにはなかった。

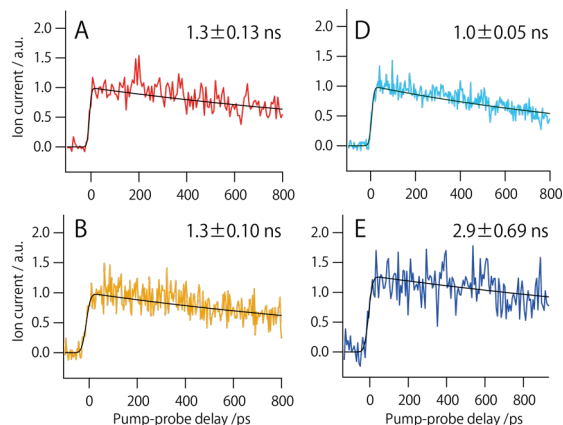


図7 ポンププローブ法によるコンフォーマーA, B, D, EのS₁状態の時間プロファイル

同様の実験をAc-Tyr-NH₂に対しても行ったところ、やはり5つのコンフォーマーが観測され、赤外スペクトルから2種類のC₇構造とC₅構造に帰属できることが分かった。寿命測定の結果は、やはりどのコンフォーマーも1~3 nsほどであり、C₇構造が大きく短寿命化することにはなかった。

これらの結果から、これまで議論されてきたC₇構造の短寿命化には疑問符がつく。しかし、含チロシンペプチドの寿命はp-クレゾールの寿命(1.7 ns) [7]と同程度であり、S₁状態からの緩和はフェノール OH 基の関与する速い緩和過程(OH 基のπσ*状態の寄与によってS₁からS₀への内部転換が加速される)が律速になっている可能性がある。つまり、本結果はC₇構造の短寿命化の一般性を否定する

ものではなく、短寿命化はあったとしても 1 ns 程度にとどまっていることを示唆していると言える。

寿命には大きな差は観測されなかったものの、上述のように C_5 構造で電子励起に伴うコンフォーマー特異的な構造変化が示唆された。これは含フェニルアラニンペプチドでは観測されておらず、フェノール OH 基による寄与であることが分かる。本研究で取り上げたペプチドではこのようなコンフォーマー特異的な構造変化が直接短寿命化をもたらすことはなかったが、上述のようにフェノール OH 基の $\pi\sigma^*$ 状態が励起状態緩和に大きく寄与することが知られており、場合によってはフェノール OH 基の関与する緩和過程とペプチド鎖が関与する緩和過程の相互作用が構造変化によってもたらされる可能性がある。

2) トリプトファンを含むペプチド

トリプトファン単体は非常にシャープな電子遷移を与えるが [8, 9]、ペプチドになると多くの場合ブロードな電子遷移となる。我々は以前に植物ホルモンの受容体の部分ペプチド GWPPV の REMPI スペクトルを測定したが、やはりブロードであった。GW は既に報告されておりシャープな電子スペクトルを与えることが分かっている [10]。そこで、GWPPV をどこまで短くするとシャープな電子スペクトルが観測されるかを検討することとした。

まず Ac-GWP-NH₂ について検討した。図 8 に REMPI 及び UV-UV HB スペクトルを示す。REMPI スペクトルは全体的にブロードであるが、シャープな構造も見られる。ブロードな電子遷移 (図中低波数側の点線) に ν_p を固定し UV-UV HB スペクトルを測定したところスペクトル A が得られ、シャープなバンドは観測されなかった。そこで、 ν_p をシャープなバンドに固定して UV-UV HB スペクトルを測定するとシャープなバンドだけから構成されるスペクトル B が得られ、両者は異なるコンフォーマー

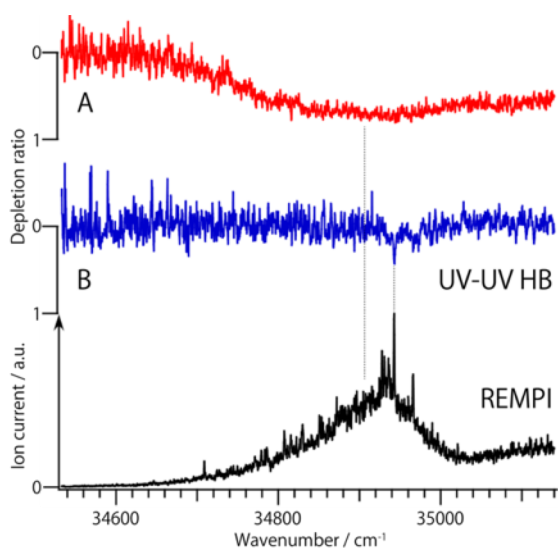


図 8 Ac-GWP-NH₂ の REMPI 及び UV-UV HB スペクトル

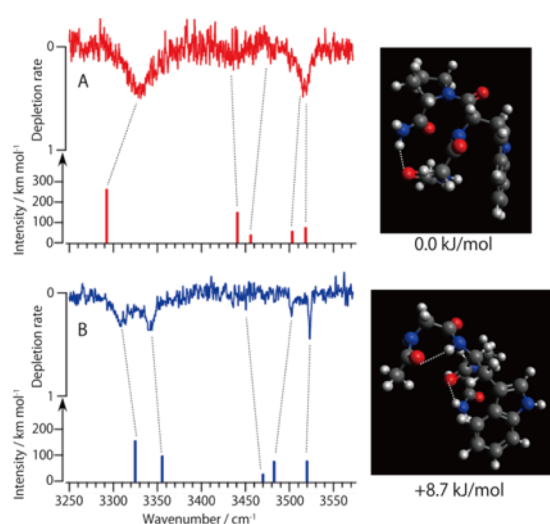


図 9 Ac-GWP-NH₂ の IR dip スペクトルと理論赤外スペクトルとの比較

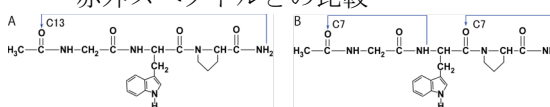


図 10 Ac-GWP-NH₂ の帰属された構造の水素結合パターン

であることが分かった。

構造を決定するためにそれぞれのコンフォーマーの赤外スペクトルを測定し、量子化学計算と比較した (図 9)。その結果、コンフォーマー A は C_{13} 構造、B は 2 つの C_7 水素結合をもつ構造であることが分かった (図 10)。コンフォーマー A が最安定構造で B はそれより +8.7 kJ/mol 不安定な準安定構造であった。

コンフォーマー A の電子スペクトルには、Ac-Tyr-NHMe の場合と異なり、シャープな構造は観測されず、速い緩和過程によるバンド広がり が顕著であると考えられる。シャープなバンドを与えるコンフォーマーも共存するものの、その寄与は小さく、それがメインとなるにはもっと短いペプチドである必要がある。そこで GW について検討することとした。上述のように GW は既に先行研究があり、シャープなスペクトルを与えることが分かっている [10]。ところが Ac-GW-NH₂ を測定したところブロードな REMPI スペクトルが観測されたため、スペクトルのブロードニングに末端の構造が寄与している可能性が示唆された。そこで N-末端をアセチル化したものとそうでないもの、及び C-末端をアミド化したものとそうでないもの合計 4 種類のペプチドについて REMPI スペクトル及び IR dip スペクトルを測定し (本報告書では割愛)、ブロードニングの有無と構造について検討した。

図 11 に各ペプチドの REMPI スペクトルと帰属された構造の水素結合パターンを示す。GW 以外では全て REMPI スペクトルはブロードであり、速い緩和過程の存在が示唆された。構造帰属を行ったところ、GW ではメインは水素結合を形成しない構造であり、またもう 1 つの共存するコンフォーマーは C_7 水素結合を形成するものの通常のペプチドに見られる N-

H \cdots O=C の水素結合ではない。一方、他のペプチドでは N-H \cdots O=C の C₇ または C₁₀ という強い水素結合をもつ構造に帰属された。以上の結果から、トリプトファン残基を含む C₇ あるいは C₁₀ などの強い水素結合構造がブロードな電子スペクトルを与えるという一般性があることが示唆された。これは Ac-GWP-NH₂ にも当てはまり、ブロードな電子遷移を与えるコンフォマー A は C₁₃ の強い環状水素結合にトリプトファン残基が含まれているが、比較的シャープな電子遷移を与えるコンフォマー B では 2 つの C₇ 構造はとるものの、トリプトファン残基がそれら環状水素結合に含まれていない。

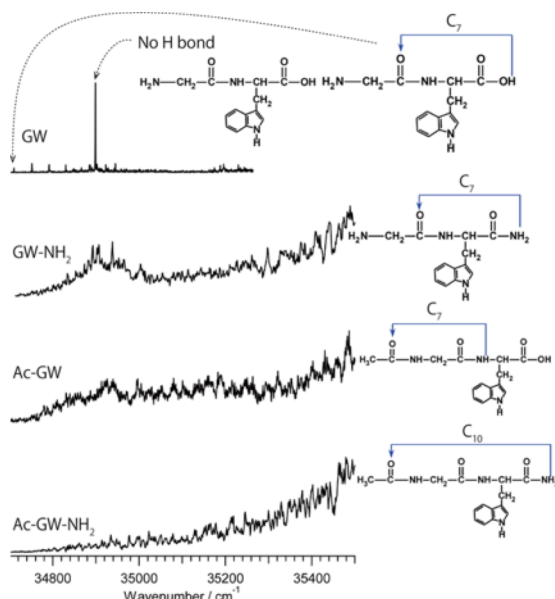


図 11 末端の異なる GW ペプチドの REMPI スペクトルと帰属された構造の水素結合パターン

3) まとめと今後の展望

先行研究として含フェニルアラニンペプチドの励起状態寿命のコンフォメーション依存性[5]、及びその理論的な解釈とその一般性について[6]の報告があった。それによれば C₇ 構造が速い励起状態緩和を誘起している可能性があるということである。本研究ではチロシン及びトリプトファンを含むペプチドに対してその一般性を検証した。含チロシンペプチドでは、C₇ 構造による励起状態緩和の加速の有無については明らかにならなかった。その理由は、チロシンではフェノール OH 基が緩和を加速しており、それが律速になっているためである。一方、含トリプトファンペプチドでは C₇ 構造の様な強い環状の N-H \cdots O=C 水素結合を有し、かつトリプトファン残基がその環に含まれるときにブロードな電子遷移が観測され、速い励起状態緩和の可能性が示唆された。この結果は、理論で指摘されたルールをもう少し一般化したものと言える。今後の理論解析を大いに期待したい。冒頭で述べた様に DNA 塩基対は水素結合構造の違いによって励起状態緩和のプロセスが大きく異なるこ

とが示唆されている。本研究で明らかになった様に、これはペプチドでも同様であり、芳香族アミノ酸を含むペプチドの光防御に寄与している可能性がある。また、水素結合構造はプロトンや金属イオンが付加すると大きく変化するため、これらが励起状態ダイナミクスに及ぼす影響も非常に大きいと言える。もちろん、その様な現象は pH や塩効果で実際に観測される訳であるが、本研究をこの様なイオン種に展開することにより、この様な現象の分子論的解明が期待され、今後の課題である。

参考文献

- [1] H. Niwa, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 13617. [2] A. Abo-Riziq, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 20. [3] W. Chin, et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 8 (2006) 1033. [4] J.A. Stearns, et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 11 (2009) 125. [5] M. Malis, et al., J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 20340. [6] W. Domcke, A.L. Sobolewski, Nat. Chem. 5 (2013) 257. [7] G.A. Pino, et al., J. Chem. Phys. 133 (2010). [8] L.C. Snoek, et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 3 (2001) 1819. [9] T.R. Rizzo, et al., J. Chem. Phys. 84 (1986) 2534. [10] I. Hünig, et al., Chem. Phys. Lett. 369 (2003) 173.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件) 全て査読有

1. N. Mayorkas, H. Sachs, M. Schütz, S. Ishiuchi, M. Fujii, O. Dopfer, I. Bar, "Structural motifs of 2-(2-fluoro-phenyl)-ethylamine conformers, Phys. Chem. Chem. Phys. **18** (2015) 1191-1201.
2. W. Y. Sohn, S. Ishiuchi, P. Çarçabal, H. Oba, M. Fujii, "UV-UV hole burning and IR dip spectroscopy of homophenylalanine by laser desorption supersonic jet technique", Chem. Phys. **445** (2014) 21-30.
3. S. Ishiuchi, K. Yamada, S. Chakraborty, K. Yagi, M. Fujii, "Gas-phase Spectroscopy and Anharmonic Vibrational Analysis of the 3-Residue Peptide Z-Pro-Ley-Gly-NH2 by the Laser Desorption Supersonic Jet Technique", Chem. Phys. **419** (2013) 145-152.

他 3 件

[学会発表] (計 13 件)

1. S. Ishiuchi, H. Wako, M. Fujii, "Development of high-cooling-efficiency quadrupole cold ion trap for conformer-selective UV spectroscopy of biomolecules", IBB12016 invited hot topics (Oxford, UK, Apr, 2016).
2. S. Ishiuchi, " Gas phase spectroscopy of complex of adrenaline and its binding site of adrenoceptor", Gordon Research Conferences "Molecular and Ionic Clusters" invited hot topics (Ventura, USA, Jan, 2016).

他 11 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石内 俊一 (ISHIUCHI, Shun-ichi)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：40338257