

令和元年5月24日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14441

研究課題名(和文) 化学進化における不斉認識と不斉転写の気相クラスター研究

研究課題名(英文) Study on chemical evolution using gas-phase clusters

研究代表者

藤原 亮正 (Fujihara, Akimasa)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10580334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では糖とアミノ酸のキラリティーに着目し、アミノ酸やペプチド、単糖や糖鎖が水素結合した低温孤立状態の気相クラスターを星間分子雲のモデルとして、分子認識と化学反応の関係を検討した。鏡像異性体選択的な反応性が観測され、気相クラスターを模擬星間分子雲とする実験的研究は、分子雲におけるキラル認識と化学進化の関係を分子レベルで検討する方法として有効であることを示した。この実験結果を基に、溶液中の鏡像異性体と立体異性体に対する定量分析法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究での化学進化に関わるキラル認識と化学反応は、遷移金属を使わない不斉化学反応である。本研究は、有機化学分野で近年急速に開発が進められている有機分子触媒の基礎的知見となり、グリーンケミストリーを発展させる研究成果となる。質量分析感度で鏡像異性体を識別する本計測法と、化学進化の歴史に関する本研究成果は、分子の個性を活かした高感度定量分析法を開拓する基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Chiral recognition between amino acids and carbohydrates in cold gas-phase cluster ions was investigated as a model for chemical evolution in interstellar molecular clouds using a tandem mass spectrometer containing a cold ion trap. The enantiomer selectivity in cold gas-phase clusters indicated that chirality of a molecule induced enantiomeric excess of other molecules via enantiomer-selective reactions in molecular clouds. Based on our results, the enantiomer- and isomer-selective phenomena we observed in the gas phase were applied for distinguishing and quantifying amino acids and carbohydrates in solution.

研究分野：物理化学

キーワード：化学進化 分子雲 分子認識 キラル認識 定量分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球上の生体分子は一部の例外を除いて L-アミノ酸と D-糖から構成されているが、ホモキラリティの起源は未だ解明されておらず様々な仮説が提唱されている。キラル分子が星間で観測され地球外起源説が有力となったが、生体分子の鏡像異性体比の偏りに至る確証は得られていない。近年、模擬星間分子雲の反応性の実験から、L-セリンが水素結合すると D-トリプトファン(D-Trp)のみ CO<sub>2</sub> 脱離する鏡像異性体選択的な光解離反応が見出された。

### 2. 研究の目的

本研究では糖とアミノ酸のキラリティーに着目し、Trp にアミノ酸、ペプチド、単糖や糖鎖が水素結合した低温孤立状態の気相クラスターを星間分子雲のモデルとして紫外光励起実験を行ない、生体関連分子のキラリ認識と光化学反応の関係を検討する。この実験結果を基に構造異性体を識別する高感度な定量分析法を開発する。

### 3. 研究の方法

スプレーイオン化法により生成した Trp と生体関連分子の水素結合錯体を質量フィルターで質量選択し、温度可変 22 極型イオントラップ (8 K) に導入した。He との多重衝突によって温度制御した後、励起光 (266 nm) を照射して Trp のインドール環を  $\pi\pi^*$  状態に励起し、生成したフラグメントイオンを反射型飛行時間質量分析計で検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) アミノ酸の分子認識

質量分析法(MS)は高い感度と選択性を持ち、生体分子を測定できることから幅広い分野で用いられているが、同一の分子量を持つ異性体の識別は難しい。様々な解析法を利用した MS/MS により、反応性の違いから構造異性体を区別することは可能だが、鏡像異性体や Leu, Ile といった構造が類似している分子は、大きな反応性の違いがないため区別することが困難である。本研究では、アミノ酸の分子認識と紫外光解離の関係を検討し、構造異性体の識別と定量分析法への応用を検証した。

Na<sup>+</sup>(Trp)(Ile)では解離反応として 1:1 錯体からの CO<sub>2</sub> 脱離、Na<sup>+</sup>(Trp)、Trp が脱離した Na<sup>+</sup>(Ile) が生成した。Na<sup>+</sup>(Trp)(Leu)でも同様のフラグメントが観測されたが、Trp 脱離の Na<sup>+</sup>(Leu)と Na<sup>+</sup>(Ile)を比較すると積分強度に違いが見られた。Leu と Ile の Na<sup>+</sup>親和性の違いがスペクトルに表れたと考えられる。この強度の違いを利用して、構造異性体 Leu と Ile を識別する定量分析法を検討した。混合溶液から生成した Na<sup>+</sup>付加 1:1 錯体( $m/z$  358)の紫外光解離によって生成された 2 つのフラグメントイオンの強度比を  $R=(\text{Trp 脱離})/(\text{CO}_2 \text{ 脱離})$  として  $\ln(R)$  を算出し、混合溶液中の Leu の比率に対してプロットした。相関係数  $r^2=0.993$  の直線が得られたことから、光解離質量スペクトルを一つ測定し、 $R$  値を参照することで、混合比未知の Leu と Ile についても識別が可能であることが示された。

#### (2) ペプチドとアミノ酸のキラリ認識

H<sup>+</sup>(D-Trp)AAA の CID スペクトルでは、NH<sub>3</sub> 脱離が観測された。NH<sub>3</sub> 脱離はプロトン化トリプトファンの CID での主反応として報告されているため、錯体中の D-Trp の末端アミノ基にプロトンが付加し、H<sup>+</sup>(D-Trp)から NH<sub>3</sub> が脱離することを示している。H<sup>+</sup>(L-Trp)AAA で観測された H<sub>2</sub>O 脱離はプロトン化オリゴアラニンの CID の主反応であるため、プロトンは AAA に付加していると考えられる。アラニン 1 つをセリンに置換したトリペプチドでは、H<sub>2</sub>O 脱離と NH<sub>3</sub> 脱離の両方が観測され、鏡像異性体間の反応性の差が小さくなったため、キラリ認識能は低下したと考えられる。他の芳香族アミノ酸と AAA では H<sub>2</sub>O 脱離のみで、D 体と L 体の反応性の違いは観測されなかった。

Phe と SAA, ASA, AAS では H<sub>2</sub>O 脱離に加えて NH<sub>3</sub> 脱離も観測された。Phe と ASA の CID スペクトルでは、D 体と L 体で H<sub>2</sub>O 脱離と NH<sub>3</sub> 脱離の強度比に差が見られた。His とトリペプチドの CID スペクトルでは H<sup>+</sup>His が観測されるが、H<sup>+</sup>(D-His)SAA では H<sup>+</sup>(D-His)が観測されなかった。これは SAA では D-His がプロトン付加しないことを示している。以上の結果より、プロトン化によって芳香族アミノ酸をキラリ認識するトリペプチドのアミノ酸配列を決定した。

#### (3) 単糖とアミノ酸のキラリ認識

Trp と 6 単糖の 1 種であるタロース(Tal)の 1:1 錯体であるヘテロキラリ H<sup>+</sup>(L-Trp)(D-Tal)とホモキラリ H<sup>+</sup>(L-Trp)(L-Tal)の紫外光解離質量スペクトルを測定した。解離反応として、H<sup>+</sup>(L-Trp)を生成する Tal 脱離が両錯体で共通して観測され、NH<sub>2</sub>CHCOOH 脱離がヘテロキラリ錯体で観測された。このことから、NH<sub>2</sub>CHCOOH 脱離は Tal の立体異性体を識別した解離反応であると考えられる。溶液中の L-Tal と D-Tal の比率に対して H<sup>+</sup>(L-Trp)(Tal)のフラグメントイオンの強度比  $R=(\text{NH}_2\text{CHCOOH 脱離})/(\text{H}^+(\text{L-Trp}))$  の自然対数をプロットした結果、この検量線によって未知の D/L 比の試料に対して、1 つの光解離質量スペクトルの強度比から鏡像体過剰率を求められることが示された。Tal の構造異性体であるマンノース(Man)、アルトロース(Alt)において、異なる光解離質量スペクトルが観測されたため、溶液中の D-Tal と D-Man の比率を変え H<sup>+</sup>(L-Trp)との 1:1 錯体に対して光解離実験を行ったところ比率に対する検量線が得られた。以上から、こ

の定量分析法が構造異性体に対しても適用できることが示せた。

#### (4) 糖鎖とアミノ酸のキラル認識

H<sup>+</sup>Trp と D-グルコース(D-Glc)の水素結合錯体の紫外光励起では、H<sup>+</sup>(D-Trp)(D-Glc)において D-Glc の蒸発で D-Trp の解離が抑制されるのに対して、H<sup>+</sup>(L-Trp)(D-Glc)では励起状態水素原子移動で誘起される L-Trp の NH<sub>2</sub>CHCOOH 脱離(C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> 結合開裂)が観測された。電荷を Na<sup>+</sup>としたときの紫外光解離質量スペクトルでは、分子の蒸発で生成する Na<sup>+</sup>Trp と Na<sup>+</sup>(D-Glc)が観測された。Na<sup>+</sup>(L-Trp)(D-Glc)の光励起では D-Glc からのプロトン化によって生成した H<sup>+</sup>Trp (*m/z* 205) が主生成物となり、H<sup>+</sup>(L-Trp)の NH<sub>3</sub> 脱離生成物 (*m/z* 188) も観測された。H<sup>+</sup>Trp は 1 eV 以下の衝突エネルギーで NH<sub>3</sub> 脱離することが報告されている。以上より、D-Glc が水素結合すると、プロトン化クラスターでは水素原子移動による C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> 結合開裂、Na<sup>+</sup>付加クラスターではプロトン化による NH<sub>3</sub> 脱離で L-Trp が解離することが明らかになった。

糖鎖とアミノ酸の反応性を検討するため、D-Glc が α1,4-グリコシド結合を形成した二糖である D-maltose と Trp で同様の紫外光励起実験を行なった。H<sup>+</sup>(L-Trp)(D-maltose)のスペクトルでは、D-Glc の場合と同様に L-Trp の C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> 結合開裂によって NH<sub>2</sub>CHCOOH が脱離した。一方、H<sup>+</sup>(D-Trp)(D-maltose) では D-Trp と D-maltose の反応生成物と帰属されるフラグメントイオンが *m/z* 282 に観測された。プロトン化クラスターにおいて、L-Trp と D-maltose の水素結合錯体では L-Trp が解離し、D-Trp と D-maltose では D-maltose が解離するというアミノ酸と二糖の鏡像異性体選択的な光解離反応が見出された。Na<sup>+</sup>(L-Trp)(D-maltose)の光励起では L-Trp が蒸発した Na<sup>+</sup>(D-maltose) が主生成物であり、分子の解離は観測されなかった。それに対して Na<sup>+</sup>(D-Trp)(D-maltose)では Na<sup>+</sup>(D-Glc)が観測され、光励起した D-Trp によって D-maltose のグリコシド結合が開裂することが明らかになった。

以上より、質量選択した低温孤立状態の気相クラスターの紫外光励起によって、アミノ酸と糖の鏡像異性体選択的な反応性が観測された。気相クラスターを模擬星間分子雲とする実験的研究は、分子雲におけるキラル認識と化学進化の関係を分子レベルで検討する方法として有効であることが示された。

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

D.T. Nguyen, N. Oki, [A. Fujihara](#), Determination of enantiomeric excess of amino acids using photodissociation of cold gas-phase Na<sup>+</sup>-containing clusters, *Journal of Mass Spectrometry* 54 (2019) [査読有](#)

<https://doi.org/10.1002/jms.4373>

[A. Fujihara](#), A. Shimada, Gas-phase N<sub>2</sub> adsorption on mass-selected hydrogen-bonded cluster ions, *Chemical Physics Letters* 718, 1-6 (2019) [査読有](#)

<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.01.029>

D.T. Nguyen, [A. Fujihara](#), Chiral recognition in cold gas-phase cluster ions of carbohydrates and tryptophan probed by photodissociation, *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 48, 395-406 (2018) [査読有](#)

<https://doi.org/10.1007/s11084-019-09574-9>

[A. Fujihara](#), Y. Okawa, Chiral and molecular recognition of monosaccharides by photoexcited tryptophan in cold gas-phase noncovalent complexes as a model for chemical evolution in interstellar molecular clouds, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410, 6279-6287 (2018) [査読有](#)

<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1238-9>

N. Oki, [A. Fujihara](#), Molecular recognition and quantitative analysis of leucine and isoleucine using photodissociation of cold gas-phase noncovalent complexes, *Journal of Mass Spectrometry* 53, 595-597 (2018) [査読有](#)

<https://doi.org/10.1002/jms.4196>

[A. Fujihara](#), H. Inoue, M. Sogi, M. Tajiri, Y. Wada, Chiral and molecular recognition through protonation between aromatic amino acids and tripeptides probed by collision-activated dissociation in the gas phase, *Molecules* 23, 162-172 (2018) [査読有](#)

<https://doi.org/10.3390/molecules23010162>

T.N. Doan, [A. Fujihara](#), Enantiomer-selective photo-induced reaction of protonated tryptophan with disaccharides in the gas phase, *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 48, 123-130 (2018) [査読有](#)

[A. Fujihara](#), N. Maeda, Quantitative chiral analysis of amino acids in solution using enantiomer-selective photodissociation of cold gas-phase tryptophan via chiral recognition, *Analytica Chimica Acta* 979, 31-35 (2017) [査読有](#)

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.027>

[ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

[藤原亮正](#), 模擬分子雲におけるキラル認識と化学進化の研究に向けて, 第 8 回イオン移動度

研究会/第72回イオン反応研究会 合同講演会 (2019.4.20 大阪府立大学) 招待講演

井上光・藤原亮正・田尻道子・和田芳直, プロトン付加で芳香族アミノ酸をキラル認識するトリペプチドのアミノ酸配列決定, 新アミノ酸分析研究会第7回学術講演会 (2017.12.4 東京)

藤原亮正, 模擬星間分子雲でのアミノ酸のキラル認識とエナンチオマー選択的光解離, 新アミノ酸分析研究会第7回学術講演会 (2017.12.4 東京)

D.T. Nguyen, A. Fujihara, Enantiomer-selective photo-induced chemical reaction between disaccharides and protonated tryptophan in the gas phase, International Symposium on "Diversity of Chemical Reaction Dynamics" (2017.7.15 Himeji)

A. Fujihara, Chiral recognition and enantiomer-selective dissociation of amino acids in cold gas-phase clusters as a model of interstellar molecular clouds, International Symposium on "Diversity of Chemical Reaction Dynamics" (2017.7.15 Himeji)

D.T. Nguyen・藤原亮正, 低温孤立状態におけるトリプトファンと糖のキラル認識と光化学反応, 第6回イオン移動度研究会 (2017.4.23 奈良女子大)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。