

業績紹介：分子動力学法による時間分解赤外スペクトルの再現

宮崎 充彦 (東工大資源研・A02 計画研究分担者)
藤井 正明 (東工大資源研・A02 計画研究代表者)

論文題目："Solvation Dynamics of a Single Water Molecule Probed by Infrared Spectra-Theory Meets Experiment"

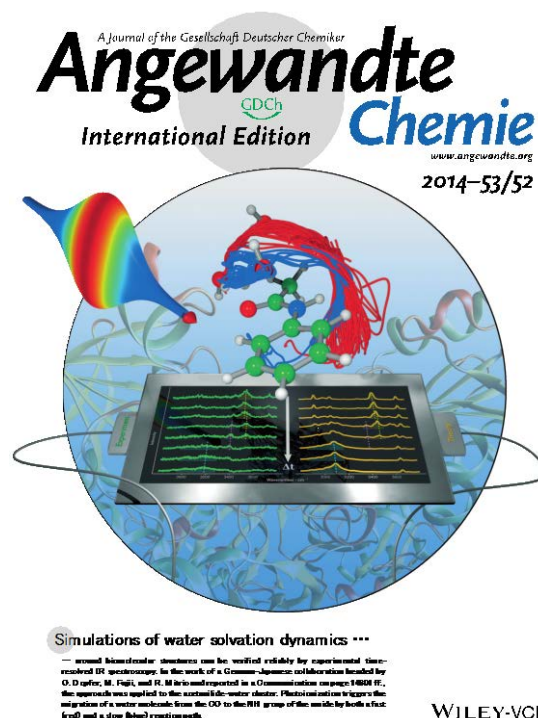
著者：Matthias Wohlgemuth, Mitsuhiro Miyazaki, Martin Weiler, Makoto Sakai, Otto Dopfer*, Masaaki Fujii*, and Roland Mitric*

雑誌巻号：Angew. Chem. Int. Ed., **53**, 14601–14604 (2014).

柔らかな分子の理解には取り得る構造とその構造転移の研究が必須である。特に多くの化学反応や生体分子・超分子の機能が溶液内で発現していることを考えると、柔らかな分子系と溶媒がどのように相互作用しているのかを探るのは極めて重要である。事実、代表的な柔らかな分子系であるタンパク質と水分子の相互作用は多くの研究者の興味を集めており、NMR、時間分解ダイナミックストークシフトなどを用い、タンパク質に水和した水の再配向運動に関して多くの研究が報告されている。しかし、その見解は大幅に食い違っており、タンパク質表面の水は長寿命で氷のように安定とするものから 1ps 以下の高速緩和があるという論文まで報告されている。[1] これは不均一な凝縮系を対象として様々な測定手段を適用すると測定法の特性によって必ずしも同じ現象を捉えていないからではないかと思われる。

溶質と溶媒分子から構成される溶媒和クラスターは構成する分子数や配向が特定できるため、溶質と溶媒の間で行われるダイナミクスを測定する上で理想的な系である。我々はアセトアニリド水和クラスターに対してピコ秒時間分解赤外分光法を適用し、アセトアニリドの-CO-NH-基のうち CO サイトに水素結合した水分子がイオン化に伴い NH サイトに再配向するダイナミクスを赤外スペクトルの変化により直接捉えることに成功している。[2] この赤外スペクトルには水分子が CO から NH に再配向する過程でいずれの官能基にも結合していない状態が出現するのが特徴で、これを再配向過程の中間状態と解釈していた。一方、この実験以前に報告されている類似系への分子動力学計算ではこのような中間状態は全く見出されておらず、理論

との間に隔たりがあった。そこでウルツブルク大 Metric 教授・ベルリン工科大 Dopfer 教授と詳細な討論を行い、初期エネルギー分布を実験条件に可能な限り近づけた。さらに on-the-fly 計算ステップを 0.1fs 単位にまで細かくすることで初めて実験で観測したスペクトルが再現でき、中間状態を再現することに成功した (図中緑のスペクトル)。以前の理論計算はここまでステップが細かくないので重要な経路を見逃していたようだが、実験結果と全く乖離していたので気づかなかったのであろう。一方、実験ではすべてのクラスターが中間状態を経由するという単純な解釈をしたが、理論計算はそれが全体の 3 割であることを示しており (図中青の軌道)、理論・実験双方にとって教訓的な結果になった。このような時間分解スペクトルの再現はほとんど報告されていなかったが、本研究で重要性が認識され、理論と実験の協奏は柔らかな系のダイナミクス研究にとって強力なチームを組めることが証明できた。



文献

[1] B. Halle, Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 2004, 359, 1207 – 1224 (2004).

[2] K. Tanabe et al., Angew. Chem. Int. Ed., **51**, 6604–6607 (2012).

業績紹介：1-ナフトール・アンモニアクラスターの励起状態プロトン移動反応のサイズ依存性を理論から検証に成功

宮崎 充彦 (東工大資源研・A02 計画研究分担者)

藤井 正明 (東工大資源研・A02 計画研究代表者)

論文題目: "Theoretical Study on the Size Dependence of Excited State Proton Transfer in 1-Naphthol-Ammonia Clusters"

著者: Toshihiko Shimizu, Shunpei Yoshikawa, Kenro Hashimoto, Mitsuhiko Miyazaki, and Masaaki Fujii*

雑誌巻号: *J. Phys. Chem. B.*, **119**, 2415-2424 (2015).

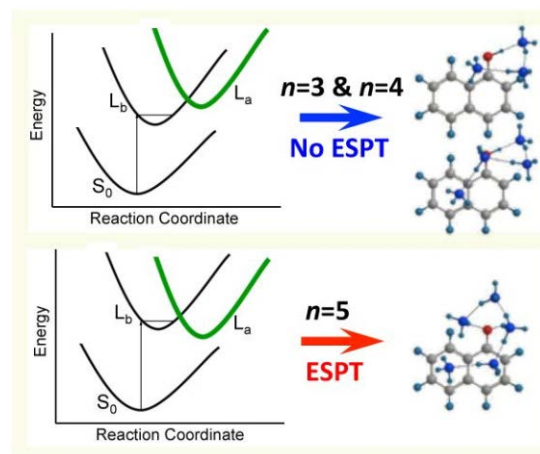
フェノールやナフトールの溶液を紫外光で励起すると可視領域で発光することが知られており、この現象からこれら芳香族酸は光励起により酸性度が上がり、プロトンを放出する Photoacid と呼ばれている。このような励起状態からのプロトン移動反応 (Excited State Proton Transfer, 略して ESPT) のメカニズムを精密に捉えるべく溶質と溶媒分子から構成される溶媒和クラスターで 20 年以上に渡って研究されているが、実は未だに結論が定まっていない現象である。この ESPT を励起状態計算からアプローチしたので報告する。

1988 年、Cheshnovsky と Leutwyler は 1-ナフトールとアンモニア数分子による水素結合クラスターの蛍光スペクトルを測定し、アンモニア 3 分子まではシャープな振動構造のスペクトルが観測されるが、アンモニアを 4 分子結合させると蛍光スペクトルが突然大きくレッドシフトし、ブロードになることを報告した。[1] 彼らはブロードな蛍光スペクトルが溶液中のナフトレートアニオンの蛍光スペクトルと類似していることから、アンモニア 4 分子を水素結合させると初めて ESPT が起きると結論した。この結果はプロトン移動という基本的な化学反応に最小限必要な溶媒数があることを示した先駆的な研究であり大きな反響を呼んだ。しかし、Zwail グループが同クラスターの励起状態の寿命をフェムト秒レーザーによるポンプ・プローブ法で測定し、アンモニア数が 3 分子水素結合すると寿命が短くなることから ESPT は 3 分子で起きる、と主張し、結論が定まらなくなった。その後、Fisher グループは Zwail グループの測定はイオン化後に溶媒が蒸発した信号が混入している可能性を指摘して再び最小分子数

を 4 分子と主張した。[3] 溶媒蒸発は Jouvet グループが高分解能質量スペクトルでさらに精密に検証し、アンモニア 4 分子までのクラスターマスペークはブロードであり蒸発の可能性のあることを指摘し、ESPT は存在しないか、起きているならアンモニア 5 分子が必要と主張したため[4]、ESPT の溶媒数依存性は皆目わからなくなった。

実験が混迷していたら理論の出番だが、励起状態計算は計算機への負荷が大きく、系の大きさと相まって信頼できるレベルでの計算は報告されてこなかった。そこで本研究では近年急速に進歩した高速計算機と励起状態を高速計算できる TD-DFT を用いて理論計算によるアプローチを行った。

計算結果はアンモニア 3 分子以上付着すると La 励起状態でプロトン移動した構造が最安定になることを示していた。しかし、アンモニア 3、4 分子とのクラスターだとプロトン移動した構造は基底状態の溶媒和構造と大きく異なっており、光励起による垂直遷移では直接アクセスできないものであった。一方、アンモニアが 5 分子あると La 励起状態でプロトン移動した構造は基底状態の溶媒和構造と類似しており、光励起によるプロトン移動が可能であった。すなわち ESPT はアンモニア 5 分子が必要であることを理論から検証できた。



文献

- [1] O. Cheshnovsky & S. Leutwyler, *JCP* **88**, 4127 (1988).
- [2] S.K. Kim et al., *CPL* **228**, 369 (1994)
- [3] D. C. Lühres et al., *PCCP* **2**, 4335 (2000).
- [4] C. Dedonder-Lardeux et al., *PCCP* **3**, 4316 (2001)

業績紹介：一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の柔らかさの違いがもたらす CPD 修復過程の赤外信号

神取 秀樹（名工大・A03 計画研究代表者）

論文題目："FTIR study of CPD photolyase with substrate in single strand DNA"

著者：I M. Mahaputra Wijaya, Tatsuya Iwata, Junpei Yamamoto, Kenichi Hitomi, Shigenori Iwai, Elizabeth D. Getzoff, and Hideki Kandori

雑誌巻号：BIOPHYSICS 11, 39-45 (2015).

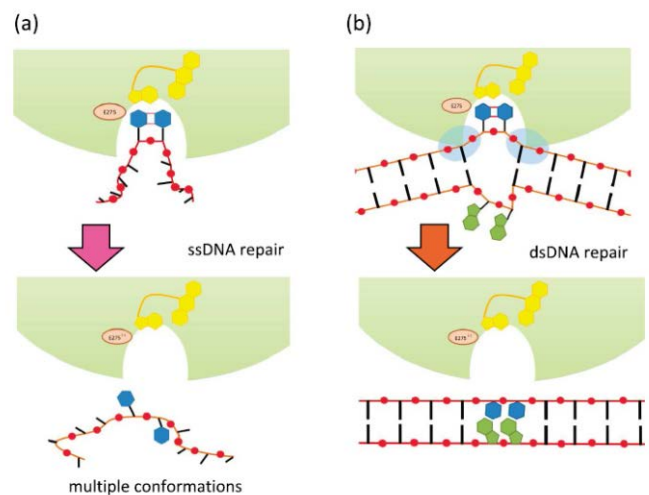
Photolyase/Cryptochrome Family は機能の柔軟性といった観点から実に興味深いタンパク質群である。なぜならば、共通の構造を持ちながらその機能は多岐に渡っているためである。DNA 光回復酵素 (Photolyase) は CPD 型、(6-4) 型のチミン二量体を光のエネルギーを利用して正常な DNA に修復することができる。クリプトクロムは植物にあっては光センサーとして機能する一方、動物では生物時計の構成要素となる。さらに渡り鳥の磁気センサーとしてもはたらくことがわかってきた。このような多彩な機能がどうやって共通の構造から実現するのであろうか？

これらのタンパク質は発色団としてフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を結合している。酸化型から一電子還元された中性ラジカル状態 (FADH^\cdot) がクリプトクロムの活性化状態と考えられている一方、二電子還元されたアニオン状態 (FADH^-) が DNA 修復における始状態である。DNA 光回復酵素の場合、光励起された FADH^- から損傷 DNA への電子移動反応を端緒として修復が実現する。

我々はこれまで光誘起赤外差スペクトル分光法を用いた生体分子の研究を行ってきた。対象としてきたのはレチナール分子を発色団とするロドプシン、フラビン分子を発色団とする LOV, BLUF ドメインであるが、数年前に光回復酵素の研究を開始した。ロドプシンなどでは通常、乾燥させたフィルム試料を水和させて実験するが、光回復酵素の場合、酵素反応を繰り返す行うため、再溶解試料や濃縮試料に対する測定系を構築した [1]。これまでに (6-4) photolyase [2], CPD photolyase [3] の修復に伴う差スペクトルを報告し、それぞれの酵素が機能する際の構造変化を明らかにしてきた。特に後者の場合、リボフラビンの合成が出来ない大腸菌株を利用した同位体標識を用いて、フラビン、

タンパク質部分、基質 DNA に由来するシグナルを帰属することに最近、成功した [4]。

本論文において、一本鎖 DNA に含まれる CPD 修復の赤外差スペクトルを測定したところ、基質であるチミンの C=O 伸縮振動 ($1720\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$) と DNA 骨格のリン酸の伸縮振動 ($1090\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$) の領域などにおいて、二本鎖 DNA とは大きく異なる結果が得られた。特に、二本鎖 DNA の場合に観測された正負の大きなピークが一本鎖 DNA の場合、消滅するようなスペクトルが得られた。基質は一本鎖であろうが二本鎖であろうが CPD なので、一見、矛盾するような実験結果に思われたが、 ^{13}C 同位体標識試料を用いて基質とタンパク質の信号を分離したところ、一本鎖 DNA においても二本鎖 DNA と同様の活性中心の水素結合変化を反映したスペクトルが得られた。両者間のスペクトル差については、修復後に二本鎖 DNA が特有の構造に折り畳まれるのに対して、一本鎖 DNA では構造多形をもつためと解釈した。分子の持つ柔らかさの違いが赤外スペクトルに反映されたものと言えよう。



[1] D. Yamada and H. Kandori, *Methods Mol. Biol.* **1148**, 361 (2014).

[2] Y. Zhang et al. *Biochemistry* **50**, 3591 (2011); Y. Zhang et al. *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 2774 (2011); D. Yamada et al. *Biochemistry* **51**, 5774 (2012).

[3] I M. M. Wijaya et al. *Biochemistry* **52**, 1019 (2013).

[4] I M. M. Wijaya et al. *Biochemistry* **53**, 5864 (2014).