

## 本論文の閲覧者各位

本論文（レーザー脱離法による核酸塩基ヌクレオチドの気相孤立化ーリン酸基のエステル化による非破壊性向上、三枝洋之、横浜市立大学論叢 自然科学系列 第61巻1・2・3合併号）の完成品冊子掲載版から図5が脱落していたため、ここでは完成原稿に図5を追加した版のPDFを公開させていただきます。完成品冊子における頁番号は行と行の間に表示いたしました（当該頁の開始位置にあたる記述の下に頁番号を振りました）。

横浜市立大学学術研究会

## レーザー脱離法による核酸塩基ヌクレオチドの気相孤立化

## ーリン酸基のエステル化による非破壊性向上

三 枝 洋 之

(横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 教授)

## 1. はじめに

核酸 (DNA や RNA) の塩基配列は遺伝情報の貯蔵と解読の主役である。このような高度な情報が、いくつかの限られた塩基分子の配列だけで伝えられることは驚くべきことである。自然がなぜこのような特定の塩基分子を選択したのかを知ることが容易ではないが、分子論的な観点から検討することで新しい知見を得ることが

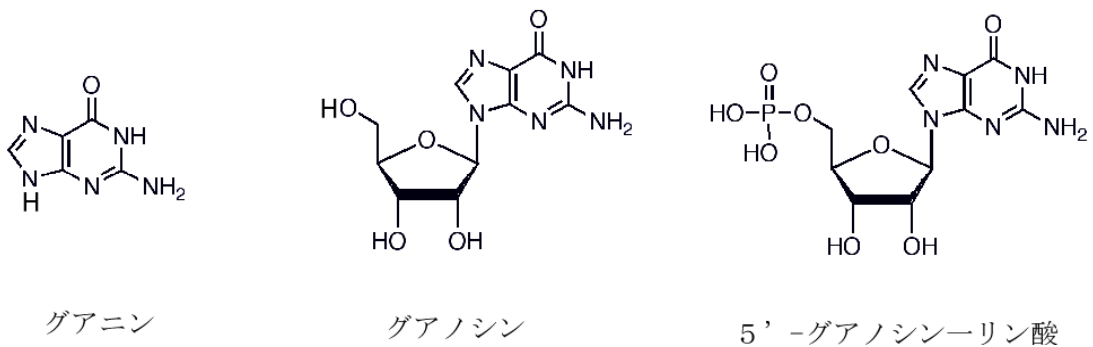


図1 核酸塩基グアニンとそのヌクレオシド、ヌクレオチド

できると期待される。我々は、このような観点からグアニン塩基やヌクレオシド(図1)の気相レーザー分光を行ってきたが、<sup>[1,2,3,4]</sup> ここではリン酸基を含む塩基ヌクレオチドへ展開する可能性について述べる。<sup>[5]</sup>

## 2. レーザー脱離法と超音速分子線法

核酸を構成する塩基分子固有の構造や性質を調べるためには、周りの環境に左右されない気相孤立状態を実現することが必要である。しかしこれらの揮発性生体分子は、加熱気化すると分解してしまうものが多い。

これを克服する一つの方法としてレーザー脱離法がある。この手法は、パルスレーザーを用いて熱的に不安定な分子を非破壊的に気化するもので、通常のMALDI法

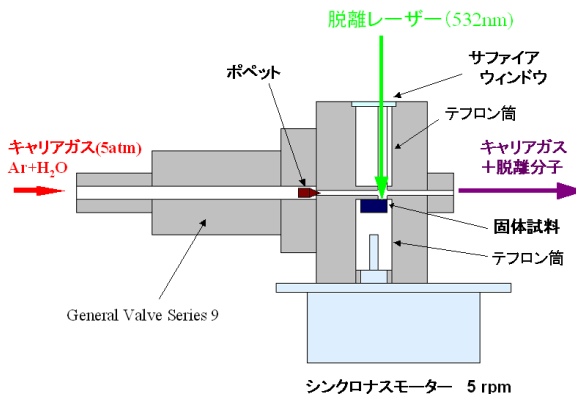


図2 レーザー脱離装置

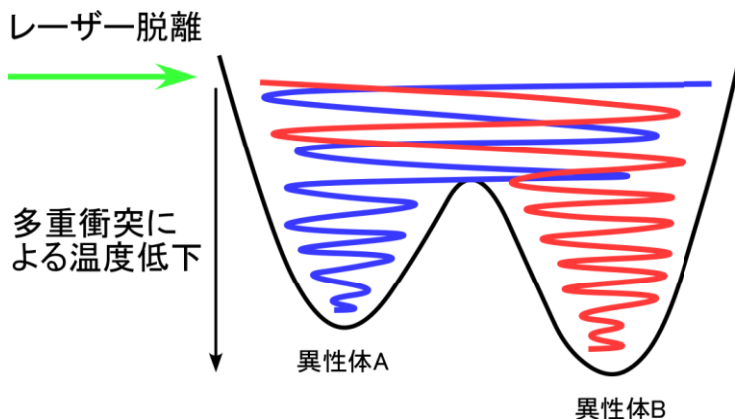


図3 超音速分子線法による分子冷却

と異なる点は「中性分子」を脱離させるものである。しかし、脱離した分子は高温であるため、エネルギー的に不安定な異性体も多く生成する。更に生成分子の機能を知る上で欠かすことのできない水和物の生成効率が低いことが欠点であった。我々はこれまで、レーザー脱離法により生成した高温分子を、超音速ジェット法と組み合わせることで極低温に冷却できる装置（図2）の開発を行ってきた。<sup>[1,2]</sup> これは、図3に示すように、脱離した高温分子をアルゴンガスとの多重衝突により冷却することで、安定な異性体として分離することが可能となる。更に、アルゴンガ

ス中に水蒸気を混入することで、その水和物を効率的に生成することができる。

### 3. 質量及び異性体を選別した クラスターの電子・振動スペクトルの測定

核酸塩基とその多量体や水和クラスターのサイズ選別は、紫外レーザー 2 光子共鳴イオン化と飛行時間型質量分析計を用いて行う。この

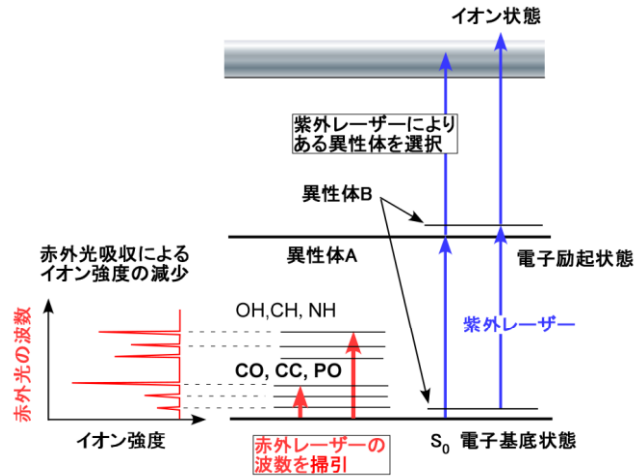


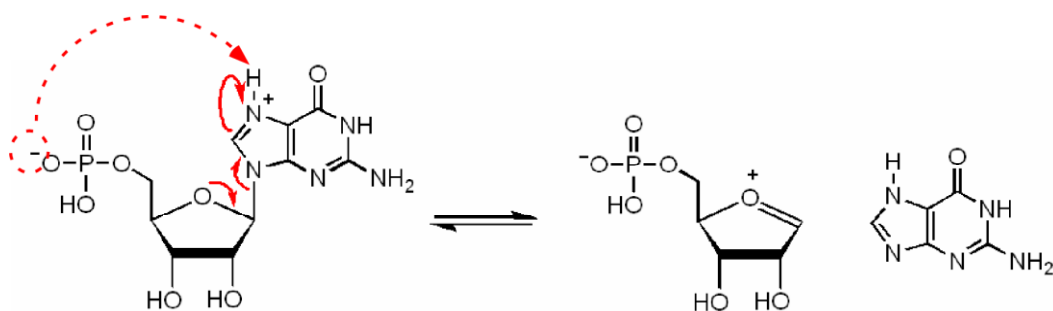
図4 赤外—紫外二重共鳴分光法

時、ある特定のイオン信号をモニターしながら、紫外レーザーの波長を掃引することで、サイズ選別した分子種の電子スペクトルを測定することができる。しかし、この電子スペクトルにはいくつかの構造異性体が含まれている可能性がある。一般に、電子スペクトルは異性体によりかなり異なることが多いので、これを利用して分離することが可能である。そこで紫外レーザー光を電子スペクトルのある波長に固定し、赤外—紫外二重共鳴分光法により赤外スペクトルを測定する。この場合、赤外レーザー光を紫外レーザーパルスに比べ、約 100 ns 先に照射し、振動励起する。もしこの赤外吸収を持つ分子種と同じ分子種の紫外吸収のイオン強度を検出する場合、イオン強度が減少する (図 4)。従って、得られた赤外スペクトルが同じ場合、電子スペクトルは同じ異性体によると帰属できる。このようにして、サイズ及び異性体選別した電子・振動スペクトルを測定することができる。更に量子化学計算から得られる赤外振動スペクトルと比較することで多量体構造や水和構造を決定することができる。

#### 4. 塩基ヌクレオチドへの展開

以上述べた手法により、核酸塩基に糖が結合したヌクレオシドやその水和物の微細構造を分子レベルで検討できるようになった。<sup>[3,4]</sup> これまでにグアニンヌクレオシド (図 1) とその水和物の電子、振動スペクトルを測定し、塩基と糖鎖への水和のし易さ、デオキシヌクレオシドとの水和構造の違いに関して興味ある結果が得られた。しかし、生体中では塩基や塩基ヌクレオシドそのものは存在せず、リン酸基が結合したヌクレオチドとして機能している。例えばグアノシンーリン酸(GMP)は、旨みの成分であることはよく知られている。またこれらが、更に結合したオリゴヌクレオチド (ポリヌクレオチド) は、DNA や RNA を構成する重要な物質である。

そこでこのような塩基ヌクレオチドを気相孤立化し、その立体構造や水和構造を検討する試みが始まった。ポリペプチドの気化は既に報告されているが、塩基ヌクレオチドへ適用された例はこれまでにない。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いたヌクレオチド負イオンの生成は数多く報告されている。<sup>[6]</sup> これは、プリン塩基ヌクレオチドにおいては、スキーム 1 に示すような脱プリン化反応が非常に効率的に進行するためである。実際、GMP をレーザー脱離すると、グアニンが生成し親イオンは観測されない。



スキーム 1 GMP の脱プリン化反応

#### 4. 1. GMP (5' -*g*-アノシン酸) のエステル化

本研究では脱プリン化反応を抑制するために、GMP リン酸基のエステル化 [モノエチルエステル GMP (EtGMP)、ジエチルエステル GMP (diEtGMP)] を試みた。これらの合成は、早川芳宏教授 (愛知工業大学工学部) と塚本眞幸助教 (名古屋大学情報科学研究科) との共同研究により行われた。スキーム 2 に合成方法の概略を示す。合成にはアミダイト法 (1)<sup>[7]</sup>と水酸基活性化法 (2)<sup>[8]</sup>の 2 つを用いた。またモノエチルエステル体も同様の方法で合成した。

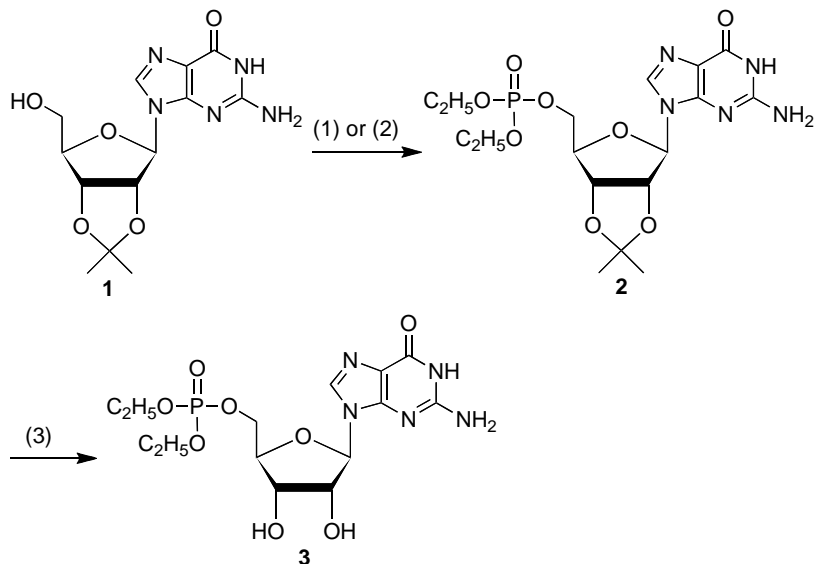
(1) diethyl chlorophosphate と diisopropylamine を THF 中で混合する。得られたアミダイトを 2',3'-*O*-isopropylidene-guanosine **1** と DMF 中で混合し diisopropylarainophosphoramidite を得る。これに imidazolium triflate を加え、更に *tert*-butyl hydroperoxide/toluene 溶液と混合すると、diisopropylarainophosphoramidite **2** が得られる。

(2) 2',3'-*O*-isopropylidene-guanosine **1** を *tert*-butylmagnesium chloride の THF 溶液に加え、更に diethyl chlorophosphate と混合すると **2** が得られる。

(3) **2** の isopropylidene protector を dichloromethane と trifluoroacetic acid の水溶液を用いて除去すると **3** が得られる。

このようにして得られた試料 (約 10 mg 程度) を、重量比 5% のグラファイトと乳鉢を用いて十分混合した。まず鋳型にグラファイト粉末を入れ、その上に試料 (+5% グラファイト) を重ねて配置し、全体を油圧プレス器を用いて約 1 トンの力で圧縮し、直径 5 mm、厚さ 2 mm の二層から成るペレットを作成した。このペレットを図 2 に示した脱離装置内に設置し、シンクロナスモーターで回転 (5rpm) しながら YAG レーザー光 (532 nm) を照射する。脱離気化した分子は、アルゴンキャリアー

ガス (5 atm) により真空中に噴出され、超音速ジェットを形成する。



スキーム 2 ジエチル 5'-グアノシン-リン酸 **3** の合成法。

合成条件: (1) (a)  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}[\text{N}(i\text{-C}_3\text{H}_7)_2]$ , imidazolium triflate, MS  $3\text{ \AA}$ , DMF, rt, 44 h; (b)  $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{OOH}$ /toluene, rt, 40 min; (2) (c)  $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{MgCl}$ , DMF, rt, 10 min; (d)  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$ , rt, 1.7 h; (3)  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ , rt, 6 h.

#### 4. 2. 2 光子共鳴

#### イオン化質量スペクトル

図 5(a)に示した GMP の場合、親イオンに相当する質量 ( $m/z=363$ ) にはピークは全く観測されず、

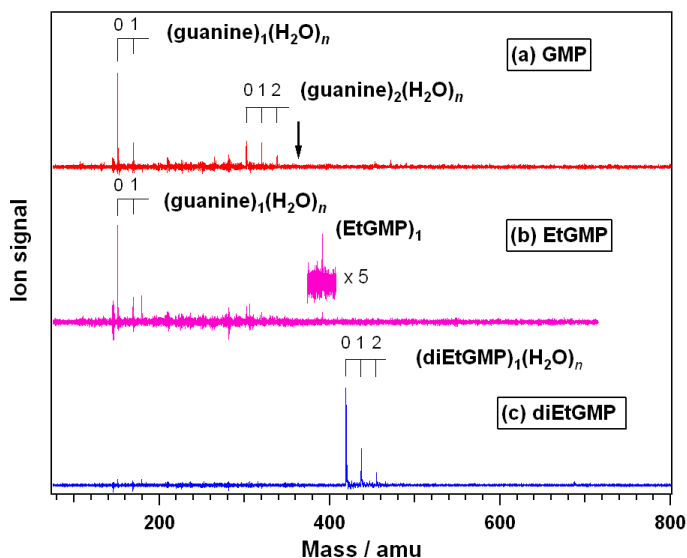


図 5 レーザー脱離 - 2 光子共鳴イオン化 (292.5 nm) により得られた質量スペクトル. (a) GMP, (b) EtGMP, (c) diEtGMP.

脱プリン化により生成した guanine ( $m/z=151$ )とその二量体(guanine)<sub>2</sub> ( $m/z=302$ )、更にそれらの水和物 guanine(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>、 (guanine)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>が観測される。図 5(b)に示したモノエチル体では、guanine のピークが強く現れるが、親イオン(EtGMP)<sub>1</sub> ( $m/z=391$ )も非常に弱い観測できる。一方ジエチル体の場合、guanine は全く観測されず、親イオンのピーク (diEtGMP)<sub>1</sub>

96

( $m/z=419$ ) とその水和物 (diEtGMP)<sub>1</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> のみが観測され、完全非破壊的に気化したことがわかる。またこれらの水和物はアルゴンガス中に含まれている水蒸気由来する。

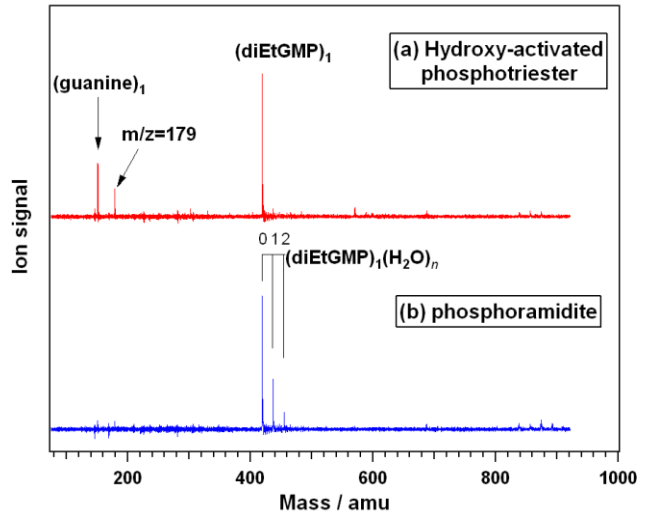


図 6 (a)水酸基活性化法と(b) アミダイト法により合成された diETGMP のレーザー脱離後に得られた質量スペクトルの比較.

次に水酸基活性化法とアミダイト法を用いて合成

した diEtGMP について得られた質量スペクトルを図 6 に比較する。すぐにわかるように、水酸基活性化法により得られた試料では、脱離により少しグアニンが生成していることがわかる。この違いはいまのところ明らかではないが、得られた結晶状態の違いや混入する不純物の違いが、脱プリン化の過程に影響しているものと推測している。

#### 4. 3. 紫外電子スペクトル

このようにして気相孤立化した diEtGMP の紫外電子スペクトルを、2光子共鳴イオン化法を用いて測定した。図 7(a)に示したスペクトルはグアノシン [図 7(c)]

97



に比べてブロードで長波長にシフトしている。グアノシンのスペクトルは、赤外振動スペクトル測定の結果、図中に示したように、グアニン塩基はエノール体で、5'-OH 基はグアニンの N3H と内部水素結合した *syn conformer* であると帰属されている。<sup>[3,9]</sup> また、スペクトル

の長波長シフトは、グアノシン-水和物で観測されたものと似ている。<sup>[3]</sup>

この水和物は、図に示したように水分子が 5'-OH 基の O 原子とアミノ基の H 原子に架橋した構造であると帰属されている。従っ

て diEtGMP のスペクトルの長波長シフトは、エノール体構造のアミノ基への

内部水素結合している可能性を示唆している。

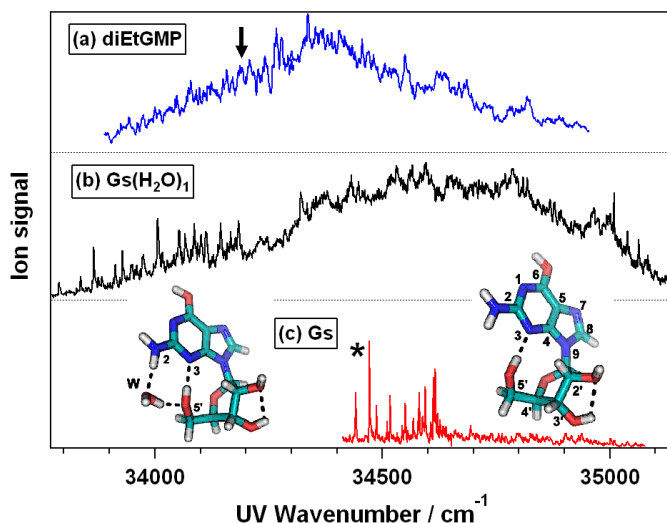


図7 紫外電子スペクトルの比較. (a) diEtGMP, (b) グアノシン-水物, (c) グアノシン. (a)の矢印は、赤外スペクトル測定に用いた UV 波長. (c)中に示した(\*)はグアノシンの純電子遷移を表す。 ※完成品冊子では図7は96頁に掲載

#### 4. 4. 赤外振動スペクトル

孤立状態における diEtGMP の立体構造と水素結合構造を決定するために、赤外-紫外二重共鳴法を用いて赤外振動スペクトルを測定した。赤外スペクトルの測定は、紫外レーザー光の波長を 292.5 nm [ $34188 \text{ cm}^{-1}$ : 図 7(a)に矢印で示す] に固定して行った。得られた結果を、グアノシン<sup>[3]</sup>と比較して図 8 に示す。図 8(a)に示した diEtGMP のスペクトルには、 $3586 \text{ cm}^{-1}$  付近にややブロードな吸収が観測される。こ

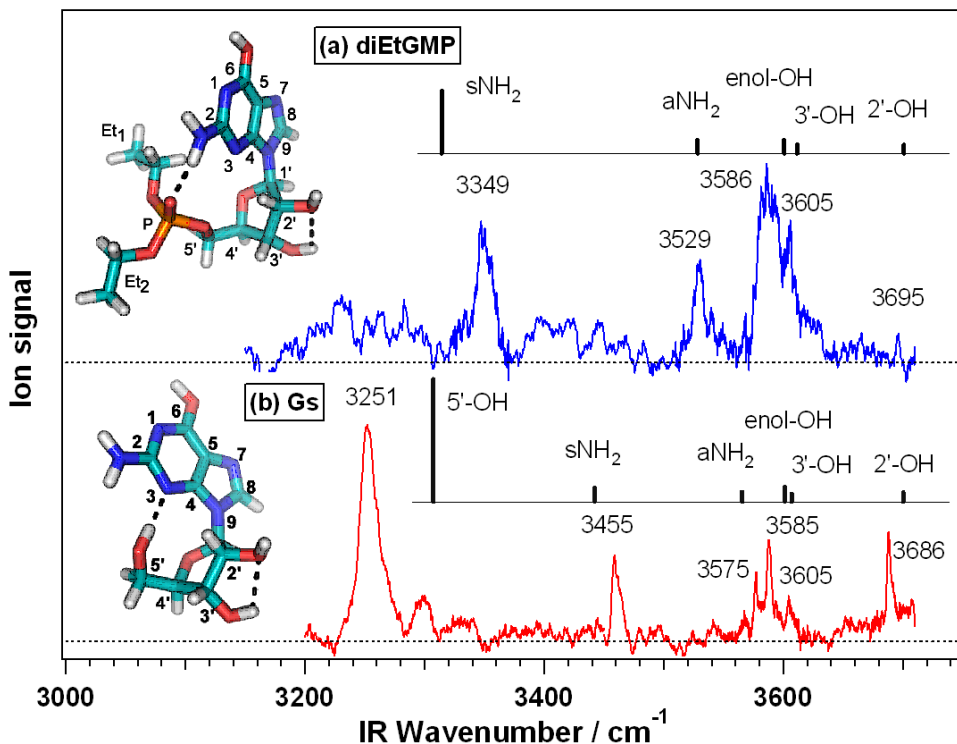


図8 (a) diEtGMP と(b) Gs の赤外スペクトル. 調和振動計算により得られたスペクトル (線で示す) と帰属された立体構造も示してある. ※完成品冊子では図8は98頁に掲載

これは Gs のスペクトル [図 8(b)] で観測されるエノール OH の伸縮振動による 3585  $\text{cm}^{-1}$  によく対応することから、diEtGMP もエノール体であることがわかる。一方 Gs のアミノ基の 2 つの NH 伸縮振動 (対称伸縮: 3455  $\text{cm}^{-1}$ 、反対称伸縮: 3575  $\text{cm}^{-1}$ ) が観測されるが、diEtGMP においては低波数(3349, 3529  $\text{cm}^{-1}$ )にシフトしている。このことから diEtGMP のアミノ基は、リン酸基の存在によりかなり影響を受けていることがわかる。そこで、次節で述べるような低エネルギーのいくつかのコンフォーマーについて、調和振動計算を行ったところ、図 8(a)中に示したコンフォーマーが最も実験で得られた赤外スペクトルを再現することがわかった。このコンフォーマーの構造は、エノール体グアニンのアミノ基にリン酸基の P=O が内部水素結合したもの (syn conformer) で、これによりアミノ基の伸縮振動が低波数シフトしたと説

明できる。またこの構造は、4. 3で述べた紫外電子スペクトルから推測される立体構造とも一致している。図 8(b)に示したGsの赤外スペクトルには、5'-OHの伸縮振動がかなり低波数(3251  $\text{cm}^{-1}$ )に観測され、またブロードであるが、これは図中に示したようにN3Hと内部水素結合しているためと解釈できる。diEtGMPでは5'-OH基が無いため、このような水素結合は存在しない。

#### 4. 5. diEtGMPの最安定構造

98

最後に *ab-initio* 量子化学計算により得られた diEtGMP の最安定構造について述べる。まず B3LYP/6-311++G(d,p) レベルで安定構造を計算した後、それぞれの構造について MP2/6-311++G(d,p) レベルで一点計算をすることにより、各コンフォーマーの相対的な安定性を評価した。結果を図9に示す。また、それぞれのコンフォー

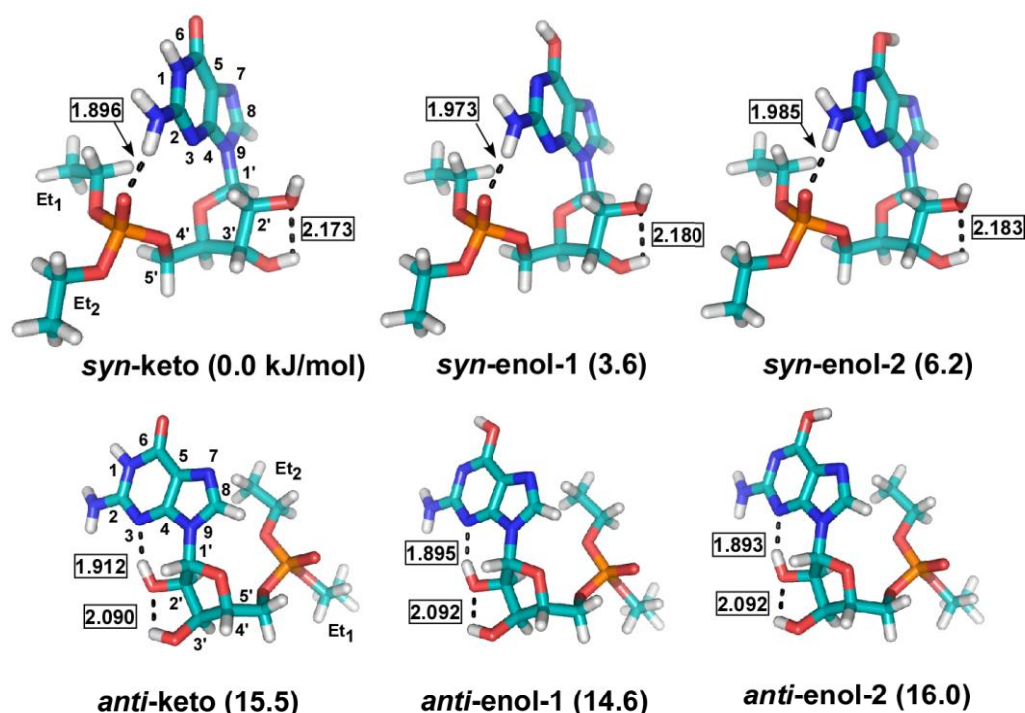


図9 diEtGMPの最安定構造. syn conformerはP=Oとグアニンのアミノ基の間で内部水素結合を持つ。一方、anti conformerは糖2'-OHのとN3Hの間で内部水素結合を形成する。それぞれについて、グアニンのエノール体(OH基の方向により1と2の回転異性体が存在)とケト体が存在する。相対的なエネルギーはkJ/mol、水素結合距離はÅで示した。

マーについて、2つのエチル基の相対的な配置により、更にいくつかの低エネルギーのコンフォーマーが存在する（図にはそれぞれについて最も安定なエチル基のコンフォーマーのみを示した）。実験では、最安定の syn-keto 構造でなく syn-enol-1 構造が観測されているが、グアニンやグアノシンでも最安定の keto 体はこれまで観測されていない。これは、keto 体が脱離した気体中に存在しないのではなく、この互変異性体の電子励起状態の寿命が非常に短い(フェムト秒スケール)ためナノ秒レーザーによる共鳴2光子イオン化法ではイオン化されないと説明されている。<sup>[10,11,12]</sup>

99

従って、diEtGMP の場合にも同様の説明をすることができる。

## 謝辞

本研究は、榊原徹教授がリン酸基の化学修飾を行うことを助言してくれたことから発展したもので、大変感謝している。グアニンヌクレオチドのエステル化は、早川芳宏教授（愛知工業大学工学部）と塚本眞幸助教（名古屋大学情報科学研究科）との共同研究により行われた。レーザー分光実験と量子化学計算は、主に浅見祐也（学振研究員 DC1）が担当した。本研究の一部は、科研費基盤研究 B (20350012)、及び科研費特定領域研究「高次系分子科学」(20050026, 22018023)の援助により行われた。

## 文献

100

- [1] Saigusa, H.; Tomioka, A.; Katayama, T.; Iwase, E. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *418*, 119.
- [2] Saigusa, H. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2006**, *7*, 197.
- [3] Saigusa, H.; Urashima, S.; Asami, H. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 3455.
- [4] Asami, H.; Urashima, S.; Saigusa, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 10466.
- [5] ここで述べる結果の一部は、Asami, H.; Tsukamoto, M.; Hayakawa, Y.; Saigusa, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13918 として公表されている。
- [6] Aravind, G.; Antoine, R.; Klærke, B.; Lemoine, J.; Racaud, A.; Rahbek, D. B.; Rajput, J.; Dugourd, P.; Andersen L. H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 3486.
- [7] Hayakawa, Y.; Kataoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12395.
- [8] Uchiyama, M.; Aso, Y.; Noyori, R.; Hayakawa, Y. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 373.
- [9] Nir, E.; Hünig, I.; Kleinermanns, K.; de Vries, M. S. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 131.
- [10] Mons, M.; Piuze, F.; Dimicoli, I.; Gorb, L.; Leszczynski, J. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 10921.
- [11] Chen, H.; Li, S. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 154315.
- [12] Marian, C. M. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1545.
- [13] Yamazaki, S.; Domcke, W.; Sobolewski, A. L. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 11965.