

3A01

グアニンヌクレオチドのリン酸基エステル化による非破壊的気化と赤外振動分光

(横浜市大院・生命ナノ¹, 愛工大・工², 名大院・情報科学³)

○浅見祐也¹ 元田彩香² 塚本眞幸³ 早川芳宏² 三枝洋之¹

【序】 生体中において単体で存在する核酸塩基ヌクレオチドは、塩基、糖、リン酸基という3つの要素を持つことで生体分子として機能している。またDNA二重らせん構造を詳細に解析する上で、塩基部での相互作用が重要であるが、そのバックボーンである糖やリン酸基の影響を無視することはできない。従来、核酸塩基ヌクレオチドの構造解析にはX線結晶回折やNMRの測定がなされてきたが、周囲に存在する環境の影響を受けるため、分子本来の構造や機能を知ることはできなかった。

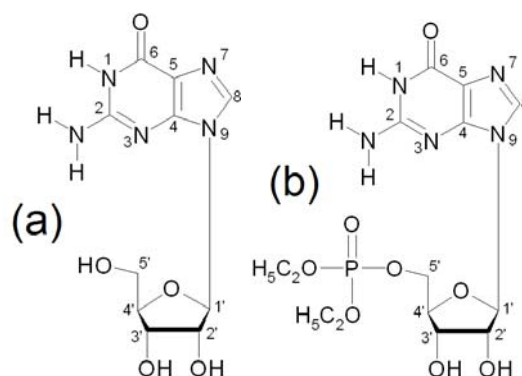


図 1. (a)Gs と (b)diEtGMP の構造。

これまで、我々はレーザー脱離-超音速ジェット分光法を用い、図 1(a)に示す核酸塩基と糖から成る化合物であるグアノシン(Gs)を非破壊的に気化し、孤立状態での微細構造を決定した。[1,2]しかし、このグアニンヌクレオチドは生体中では単体で存在しないため、リン酸基を含めたグアニンヌクレオチドとして議論する必要がある。しかしながら、一般的にヌクレオチドは、常温で放置しても脱プリン化反応が進行するため、非破壊的に気化することは極めて困難であった。

そこで、図 1(b)に示すようにリン酸基部をジエチルエステル化したジエチルグアノシン 5'-モノホスフェート(diEtGMP)を用いることで安定した気化を試みた。また電子スペクトル、赤外振動スペクトルの測定と理論計算を駆使し、安定なコンフォマーの帰属を試みた。

【手法】 合成した diEtGMP[3,4]と市販のグアノシン 5'-モノホスフェート(GMP)類を対象に、レーザー脱離-超音速ジェット冷却法を用い、分子を気相孤立化させた。冷えた試料気体に対して、二光子共鳴イオン化(R2PI)により電子スペクトルを測定し、さらに赤外振動スペクトルの測定を行った。また理論計算により、様々なコンフォマーの安定構造と振動数を計算した。基底関数は全て 6-311++G(d,p)を用い、構造最適化には B3LYP 法、相対エネルギーは MP2 法の一点計算により評価した。また相対エネルギー 5kJ/mol 以内の安定構造に対して、B3LYP 法で調和振動計算を行った。

【結果】 グアニンヌクレオチドのリン酸基エステル化による非破壊的気化：図 2(a)に示すように、リン酸基がエステル化されていない GMP では、脱離によるフラグメントであるグアニン ($m/z=151$)、またその二量体 ($m/z=302$)が強く観測され、GMP 由来の信号 ($m/z=363$)は観測されなかった。このことから、この化合物では脱離時に、脱プリン化反応を生じている可能性が示唆される。一方、図 2(b)に示す diEtGMP では親イオンのピーク ($m/z=419$)が初めて観測された。この diEtGMP は脱離によるフラグメントが極めて少ないため、リン酸基部のエステル化は GMP の非破壊的な気化を飛躍的に促進させると考えられる。

さらに、図 2(c)に示すようにキャリアガス中に微量の水蒸気を含ませた条件下では、高次の水和クラスターが観測された。Gs で同様の測定を行った場合と比較しても、より高次の水和クラス

ターが安定に生成していることから、リン酸基を含む特異的な水和構造を形成している可能性が示唆される。

赤外振動スペクトルと調和振動計算：図3に(a)diEtGMPと(b)Gsの赤外振動スペクトルと理論計算の結果を並べて示した。両者を比較すると、糖の2'-OH、3'-OH伸縮振動(3695 cm^{-1} 、3605 cm^{-1})と、塩基のenol-OH伸縮振動(3586 cm^{-1})に一致がみられた。しかし、アミノ基の対称、反対称伸縮振動(sNH₂、aNH₂)は、Gsに比べて大きくレッドシフトしている。このことは、リン酸基とアミノ基の間に内部水素結合が形成することを示唆する。従来Gsでは、塩基部の互変異性体keto、enolのうち、enol体のみが観測されており、糖5'-OHは塩基N3と内部水素結合を形成する[図3(b)]と帰属されている。[1] このことは、diEtGMPにおいても同様に分子内水素結合を持つenol体のコンフォーマー[図3(a)]であることを強く示唆する。

そこで、このコンフォーマーについて、調和振動計算を用いて構造の帰属を試みた。この結果、図3(a)diEtGMPと図3(b)Gsの構造間でみられるアミノ基の振動数のレッドシフトも実験値を再現し、図3(a)に示す構造であると結論できる。これにより、リン酸基と塩基間に形成する水素結合の存在が初めて明らかになった。

今後、リン酸基エステル化によるレーザー脱離法を用いることで、より高次の核酸塩基ヌクレオチドとその水和物を対象にした非破壊的気化と構造解析への展開が期待される。

[文献]

- [1] H. Saigusa, S. Urashima, H. Asami, *J. Phys. Chem. A*, 2009, 113, 3455.
- [2] H. Asami, S. Urashima, H. Saigusa, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, 11, 10466.
- [3] Y. Hayakawa, M. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 12395.
- [4] M. Uchiyama, Y. Aso, R. Noyori, Y. Hayakawa, *J. Org. Chem.* 1993, 58, 373.

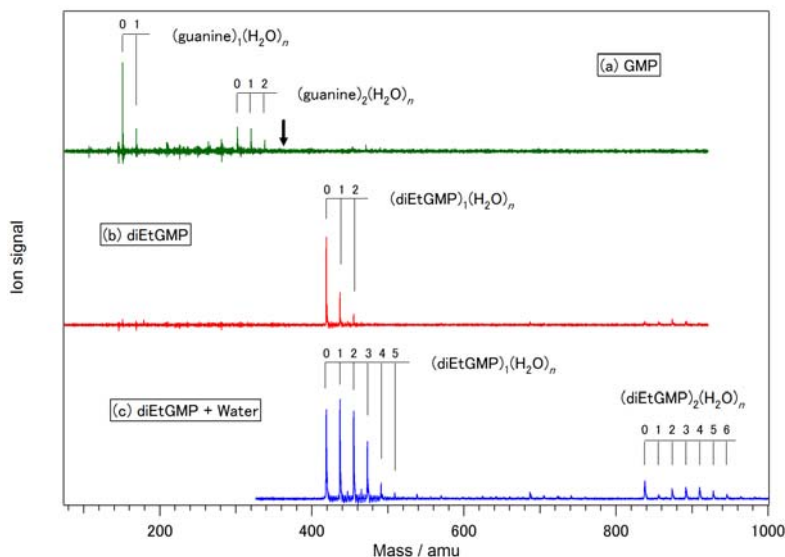


図2. R2PIによるTOF-massスペクトル。(a)GMP。(b)diEtGMP。(c)はキャリアガス中に水蒸気を加えた場合のスペクトル。またGMPの質量($m/z=363$)を(a)に矢印で示した。

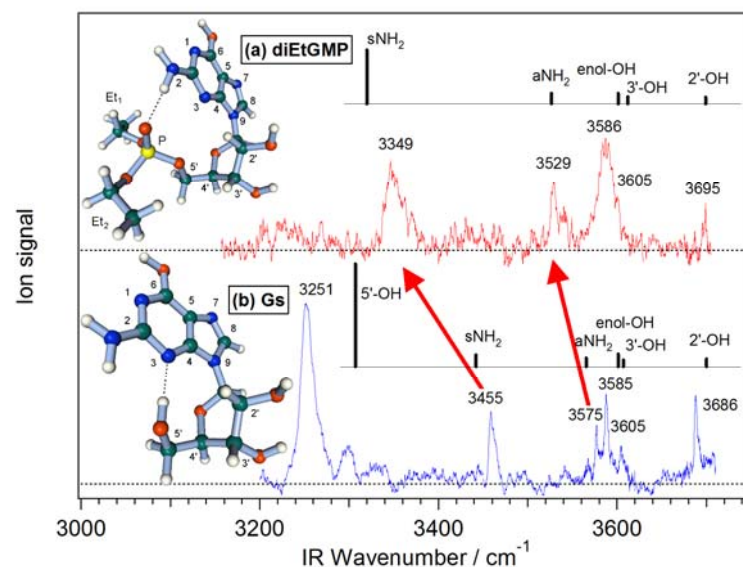


図3. 赤外振動スペクトル。(a)diEtGMPと(b)Gsについて実験値と理論計算による振動数を比較し、構造を帰属した。scaling factorは0.957を用い、図中には帰属された構造図をそれぞれ示した。またアミノ基の対称、反対称(sNH₂、aNH₂)伸縮振動にみられるレッドシフトを矢印で示した。