

## 液滴分子線赤外レーザー蒸発・紫外光解離分光法による 気相単離リゾチームの水和構造

学習院大院理

○河内宣志, 浅見祐也, 河野淳也

### Hydration effect on lysozyme in gas phase studied by UV-photodissociation spectroscopy in combination with droplet-beam IR laser ablation

○Norishi Kawauchi, Hiroya Asami, Jun-ya Kohno

*Department of Chemistry, Gakushuin University, Japan*

**【Abstract】** Proteins are usually present in aqueous solution, interacting with ambient water molecules. Therefore, it is of importance to elucidate the hydration effect of the protein molecules, which affects a valence state of the protein molecules. In this study, we aim to establish a method for the structural analysis of gas-phase proteins and reveal the interaction between the protein and the water molecules under a valence-selective condition using an electrodynamic ion trap technique. We observed a UV-photodissociation spectrum of the lysozyme (Lys) isolated in the gas phase by a droplet-beam IR laser ablation method. In the UV-photodissociation spectrum of  $\text{Lys}^{2+}$  at deep UV region (215-275 nm), UV-photodissociation products,  $\text{H}^+$  and  $\text{H}_3\text{O}^+$ , are observed by irradiation of the UV laser onto the trapped  $\text{Lys}^{2+}$  ions. Although the absorption band observed at 220 nm in a conventional UV-absorption spectrum of the Lys in the aqueous solution, a peak observed by UV-photodissociation of  $\text{Lys}^{2+}$  locates at around 230 nm, which suggests the structural difference between the gas phase and the liquid phase.

**【序論】** タンパク質は生体中で周囲に存在する水分子や様々な化学種と相互作用している。このような周囲の環境がどの程度タンパク質の分子構造に影響を与えているかを解明するためには、孤立気相状態での構造と水溶液中での構造の違いを明らかにすることが重要となる。この水和構造は、タンパク質分子の価数にも依存すると考えられる。本研究では、液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いてタンパク質(リゾチーム, Lys)イオンの気相単離を行い、四重極型イオントラップ装置[1]を用いて Lys イオンの価数選択的なトラップを行った。また、トラップした Lys イオンに紫外光(215-280 nm)を照射することで紫外光解離スペクトルを測定し、水溶液中での紫外吸収スペクトルとの違いを明らかにした。

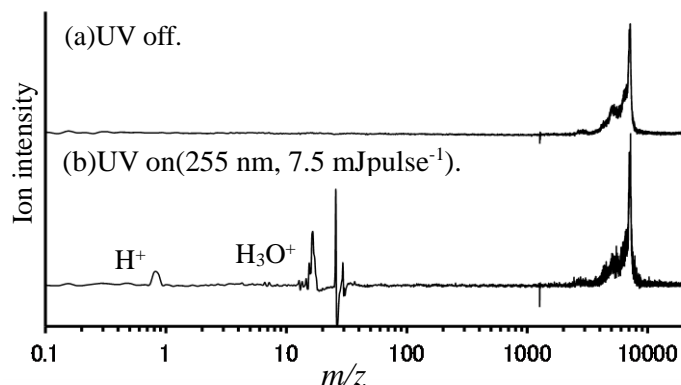
**【実験方法】** 200  $\mu\text{M}$  の Lys 水溶液をノズルから直径約 70  $\mu\text{m}$  の液滴として大気中に射出した。生成した液滴は3段階の差動排気を通り高真空下( $\sim 2 \times 10^{-6}$  Torr)に導入し、円筒状のリング電極とそれを挟むエンドキャップ電極からなる質量分析装置の加速領域に到達させた。リング電極内部に到達した液滴に、水の OH 伸縮振動に共鳴する赤外レーザー光 ( $3591 \text{ cm}^{-1}$ ,  $4.6 \text{ mJ pulse}^{-1}$ ) を集光し、溶液中の Lys イオンを気相単離した。リング電極に RF 電圧(190 kHz,  $1.6 \text{ kV}_{\text{p-p}}$ )を印加することにより、生成したイオンのうち  $\text{Lys}^{2+}$  の選択的トラップを行った。70 ms トラップ後にエンドキャップ電極にパルス電圧を与えて加速し、飛行時間型質量スペクトルを測定した。また、トラップされた気相  $\text{Lys}^{2+}$  イオンに紫外レーザー光(波長 215–275 nm, 強度  $5.4\text{--}9.0 \text{ mJ pulse}^{-1}$ )を照射し、光解離信号を観測した。

**【結果】** トラップした  $\text{Lys}^{2+}$  イオンに紫外光を照射していない場合、照射した場合の質量スペクトルをそれぞれ図 1a、b に示す。図 1 より  $\text{Lys}^{2+}$  イオンへの紫外光照射によって、光解離信号として  $\text{H}^+$  及び  $\text{H}_3\text{O}^+$  が観測されたことがわかる。これらの光解離信号はレーザー強度依存性の測定により、二光子過程で生じることがわかった。それぞれのイオンをモニターし、気相  $\text{Lys}^{2+}$  イオンの光解離スペクトル(215–275 nm)の測定を行った。 $\text{H}^+$ 、 $\text{H}_3\text{O}^+$  に対する光解離スペクトルをそれぞれ図 2a、b に示す。両イオンは  $\text{Lys}$  イオンが紫外光を吸収することによって生成したと考えられる。したがって光解離スペクトルは気相  $\text{Lys}^{2+}$  イオンの紫外吸収スペクトルに対応している。図 2c に  $\text{Lys}$  水溶液の紫外–可視吸収スペクトルを示す。 $\text{Lys}$  水溶液は 220 nm にペプチド結合に由来する吸収の肩が観測できるが、気相  $\text{Lys}^{2+}$  イオンでは 225–230 nm に吸収極大をもつことがわかる。

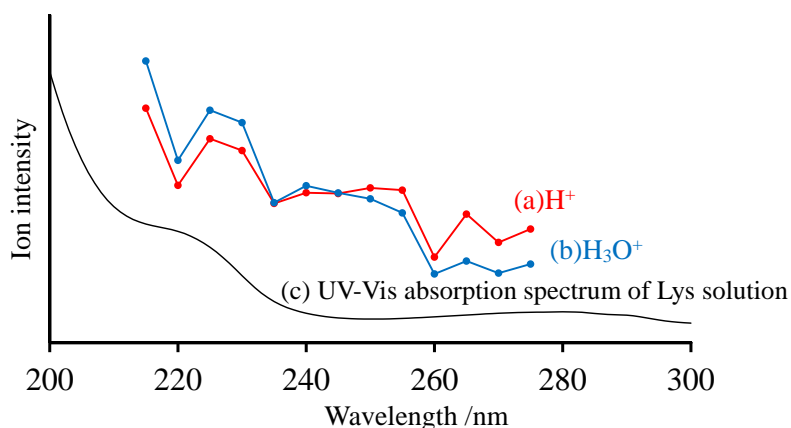
**【考察】** 気相中では水溶液中に比べ、吸収波長が長波長側へシフトした。その理由は以下のように考えられる。リゾチーム-水分子の間のポテンシャルエネルギーを図 3 に示す。液相ではリゾチームの周りに水分子が多数存在するため溶媒和の効果が大きく、基底状態と電子励起状態の間で安定構造が大きく異なる。しかし、気相中ではリゾチームの周囲に存在する水分子の量が希薄なため、励起前後での構造変化は小さくなる。ゆえに、液相では気相に比べ垂直遷移に必要なエネルギーが大きくなり、気相よりも短波長に吸収が見られたと考えられる。

**【参考文献】**

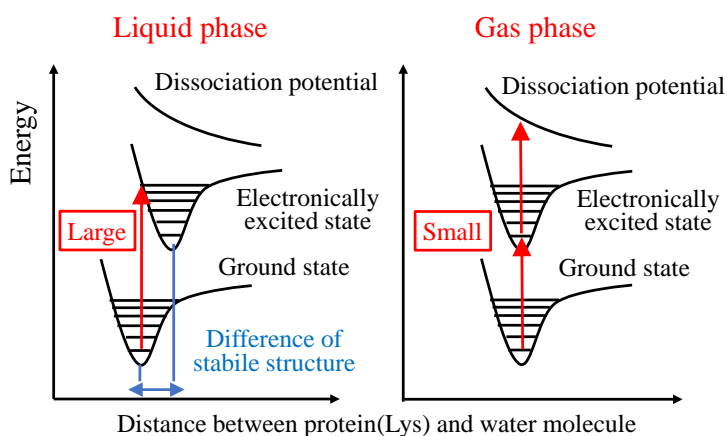
[1] J. Kohno, T. Kondow. Chem. Lett., 39, 1220-1221 (2010).



**Fig. 1.** Mass spectra of trapped  $\text{Lys}^{2+}$  ions. Trapping time, RF frequency, RF voltage were set to 70 ms, 190 kHz, 1.6 kV<sub>pp</sub>, respectively. (a) UV off. (b) UV on(255 nm, 7.5 mJpulse<sup>-1</sup>).



**Fig. 2.** UV-photodissociation spectra of  $\text{Lys}^{2+}$  ions monitored at (a)  $\text{H}^+$ , (b)  $\text{H}_3\text{O}^+$ , (c) UV-Vis absorption spectrum of  $\text{Lys}$  aqueous solution. The ion intensity of  $\text{H}^+$  indicates the values three times stronger.



**Fig. 3.** Potential energy of ground state, electronically excited state and dissociation potential versus the distance between protein( $\text{Lys}$ ) and water molecule in the gas or the liquid phase.