

令和元年5月25日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05696

研究課題名(和文) 分子の新しい立体構造解析法を目指した蛍光検出円二色性の再定義

研究課題名(英文) Redefinition of fluorescence-detected circular dichroism for a practical stereo-structure analysis

研究代表者

根平 達夫 (Nehira, Tatsuo)

広島大学・総合科学研究科・准教授

研究者番号：60321692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 独自開発した装置の実用化を目指し、蛍光検出円二色性(FDCD)理論の再定義と観測メカニズムの解明を追求した。いくつかの有機小分子のFDCDが、透過光CDとは異なる曲線を示した。FDCDでは蛍光検出の際に複数の消光経路がそれぞれCDを与えて混成すると仮定し、理論計算による模索を続けている。タンパク質の蛍光検出CDでは、蛍光無輻射エネルギー伝播を経由する検出経路を仮定し、キラル蛍光ドナーとアキラルアクセプターを合成したが、低収率のためモデルの見直しを迫られている。これらの過程で、いくつかの新規天然有機化合物についてCDスペクトルの理論計算および全合成により絶対配置を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子の立体構造の決定は一般に高コストかつ長時間を要する場合もある。本研究は、分子の立体構造決定の迅速かつ高感度な新しい選択肢を提供しようとするものである。独自開発した装置を手に、研究開始時の目標は測定理論の再構築であったが、研究期間内には実験と理論計算による理論の再構築には至らず、観測メカニズムの解明を狙ったモデル合成は低収率のため再検討を余儀なくされた。なお、研究の過程で培った手技と経験を応用して、他の研究グループとの共同研究としていくつかの新規天然有機化合物の構造決定に貢献した。

研究成果の概要(英文)： Aiming at a practical stereo-structure analysis with fluorescence-detected circular dichroism (FDCD) using our original artifact-free device, revision of FDCD theory and observation mechanism was pursued. It was experimentally found that the FDCD spectra of some organic small molecules were altered from the traditional CD spectra. Supposing that this alternation may be caused from multiple fluorescence paths, theoretical calculations were attempted. For protein FDCD, supposing that an achiral acceptor can report the chirality from donors through fluorescence resonance energy transfer, a naphthalene-based chiral donor and an anthracene-based achiral acceptor were synthesized. Although the absorption and emission properties were good enough, the yield of synthesis was not good. A new model design is required. Through the research, the absolute configurations of some natural organic compounds were determined as collaboration with other research groups.

研究分野： 構造有機化学

キーワード： 円二色性 蛍光 絶対配置 タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究で注目する蛍光検出円二色性 (FDCC) は、1974 年に最初の論文が発表されて以降、80 年代に応用研究が模索された。しかし分子構造とは無関係の信号 (FDCC アーティファクト) が混入する問題が明らかになり、これを解決することができない状況が続いた。研究代表者らは 2005 年にこの FDCC アーティファクトを生じることのない新しい測定装置を提案し、この装置を用いて小分子での測定感度を向上させることを明らかにした。続いて 2012 年にはこの装置をタンパク質に適用し、局所的な立体構造の変化を感度良く測定できることを示唆する結果を得ていた。ただし FDCC は、ここまで分子の立体構造を解析する手段として、一般的な方法になるには至っていない。

2. 研究の目的

この研究で大目標としたのは、FDCC を実用に耐える構造解析法として確立することであり、FDCC の特長を活かして既知の方法では困難であった構造解析の可能性を見出し報告することであった。FDCC をどのように有機分子の構造解析で従来からある透過光の円二色性 (CD) と使い分けて活用するか、FDCC をタンパク質に適用した場合に「立体皇后解析のピンポイント解析法」としてどう確立するかという課題を出発点にして、(1)有機分子の FDCC と CD との違いは何か、(2)FDCC によるピンポイント解析で観測できる局所構造とは何か、(3)局所構造間の相互作用は FDCC にどのように影響するか、という 3 つの命題に答えを用意することで、新しい立体構造解析法の開発になると考えて研究を開始した。

3. 研究の方法

目的の(1)に関連した有機小分子を使った実験で、励起子キラリティー系の単純な分子ですら FDCC が透過光 CD と異なる曲線を与える例があった。さらに、タンパク質の部分構造でもあり蛍光基でもあるトリプトファン (Trp) の FDCC スペクトルも、透過光 CD とは異なる曲線を与えた。すなわち、既知の FDCC 理論 (有機小分子では FDCC は CD と同じ曲線を与えるというもの) には修正が必要であり、この修正点を明確に定義するためには吸収された光エネルギーが分子内でどのような経路をたどって蛍光に至るのかを、それぞれの分子軌道が示す旋光強度と関連づけながら解析する必要がある。このため本研究では量子化学計算により関連分子の系統的な電子遷移モーメントの解析を進めた。

目的の(2)と(3)についてはこれまで、タンパク質の局所構造を FDCC によりピンポイントで観測できることを示唆する実験結果は得られていたが、局所構造を定義することはできていない。FDCC では蛍光を検出していることから蛍光基の発する蛍光を観測していることは間違いない。そこで FDCC では観測機構にキラルドナーからアキラルアクセプターへのエネルギー移動 (FRET) が関与すると予測し、適当なスペーサー分子にワンポット導入可能なキラルドナーを合成した。また、FDCC の応用研究として、チューブリンの重合化反応の追跡を試みた。

その他、キラル分子の構造決定法の研究を広く捉え、他の研究グループとの共同研究としていくつかの新規天然有機化合物の絶対配置を決定した。基本的なアプローチは、量子化学計算により CD スペクトルを予測し、これを実験より得られる CD スペクトルと比較することにより絶対配置を決定した。海洋天然物である Dolapyrrolidone についてはこの方法で絶対配置決定に至らず、アミノ酸誘導体を出発原料として全合成した。

4. 研究成果

有機小分子の FDCC が透過光 CD と一致しないという結果は、ほとんど唯一の蛍光アミノ酸である Trp にも見られる。よってまず Trp の CD スペクトルを量子化学計算によって再現しようと試みた。Trp の場合には、吸収スペクトルでは非常に弱く見える波長領域に FDCC の目立ったバンドが観測された。この結果を受け、吸収バンドから蛍光発光までの分子内エネルギー経路はそれぞれ効率が異なり、このため弱い吸収のバンドが強い蛍光につながる場合があり、Trp もその一例に過ぎない、との仮説を立てている。しかし現在までのところ、Trp の透過光 CD ですら精度良く予測できる条件を見いだせておらず、残念ながら定性的な議論にとどまっている。量子化学計算による透過光 CD の計算は、化合物系によって再現性の良さに差があり、どのような化合物にどのような計算条件が良いのかは体系化されていない。下にも示すように、量子化学計算の化合物系に対する適切な計算条件を見出すには、現段階では可能な限り経験値を上げるのが最良の策と考えている。

タンパク質の局所構造には FRET が密接に関わると仮定して、キラルドナーの CD がエネルギー移動によってアキラルアクセプターに伝播し、FDCC はそれを観測すると考えた。これを直接証明する実験系として、FRET を示すドナーとアクセプターの組合せに基づき、キラルドナーとアキラルアクセプターを、長さを自由に選べるスペーサーでつなぐ分子デザインを考えた。スペーサーにはプロリンが連続した分子は剛直な構造をとることを利用してオリゴプロリンとし、ペプチド固相合成により 12 個まで長さを自由に選んで連結できることを確認した。ドナーとアクセプターの組合せとしては、明瞭な CD 励起子カップリングを示すナフトエートをドナーとし、アクセプターに置換アントラセンを選び、簡単なモデルを合成してこれらの組合せが蛍光波長の点では非常に良いことを確認した。キラルドナーとしては、明瞭な励起子キラリティーのパターンを示し、かつスペーサーに簡単な反応で連結できる官能基を備えた構造を考え、グルコ

ース骨格をもつキラルドナーを合成した。合成したキラルドナーは確かに明瞭な励起子カップリングを示したが、非常に残念なことに全行程を通した収率があまりに低く、キラルドナーを再設計することにした。現在はビスナフトールをキラルドナーの基本骨格として、効率の良い連結基の導入法を誠意検討している。

チューブリンの重合化反応を追跡するため、蛍光タグとして IAEDANS を導入した状態で FDCC を測定した。結果、FDCC 信号の若干の変化は見られるものの、偏光の状態が大きく変化するため帰属不明の FDCC ピークが変化するというものであった。蛍光タグの導入をせず内在性の Trp に由来する蛍光信号を検出して FDCC を測定しようと試みたが、感度不足により非常にノイズの多いスペクトルが得られるのみであった。

本研究にも密接に関連するキラル分子の構造決定法の研究の一環として、いくつかの新規天然有機化合物の絶対配置を決定した。中でも、構造研究の東京海洋大学の永井らが単離・構造決定した Dolapyrrolidone は、以前から海洋天然物の部分構造としては知られていたが、最近初めて独立した化合物として単離された。まず定法に従って CD スペクトルを理論計算により予測したが、明瞭な結論を得ることができなかった。そこでフェニルアラニンを原料として両鏡像体を全合成し、それらの CD スペクトルの比較、Pt 錯体を利用した X 線結晶解析、キラルラムを利用した光学的解析をおこない、この天然有機化合物の絶対配置が非天然型アミノ酸の絶対配置と同じ D-フェニルアラニンに由来するものであることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- ① Kohei Kazuma, Yuka Isobe, Haruka Asahina, Tatsuo Nehira, Motoyoshi Satake, Katsuhiko Konno*, Crataegusins A and B, new flavanocoumarins from the dried fruits of *Crataegus pinnatifida* var. *major* (Rosacea), *Natural Product Communications*, 11 (7), 965-969, 2016. 査読あり
- ② Natsuki Tanokashira, Sanako Kukita, Hikaru Kato, Tatsuo Nehira, Esther D. Angkouw, Remy E. P. Mangindaan, Nicole J. de Voogd, Sachiko Tsukamoto*, Petroquinones: Trimeric and dimeric xestoquinone derivatives isolated from the marine sponge *Petrosia alfiani*, *Tetrahedron*, 72 (35), 5530-5540, 2016. DOI: 10.1016/j.tet.2016.07.045 査読あり
- ③ Takanori Suzuki,* Takuma Kuroda, Hitomi Tamaoki, Sho Higasa, Tatsuo Nehira, Ryo Katoono, Yusuke Ishigaki, Kenshu Fujiwara, Takanori Fukushima, Hidetoshi Yamada, Oxidative Desulfurization of Electron-Donating 5,5,7,7-Tetraaryl-5,7-Dihydrodibenzo[c,e]thiepins and the Related Heterocycles: Generation of Dicationic Dyes upon Two-Electron Oxidation, *Heterocycles*, 95 (2), 816-829, 2017. 査読あり
- ④ Shoko Hara, Naoki Ishikawa, Yasumasa Hara, Tatsuo Nehira, Kanae Sakai, Tohru Gono, Masami Ishibashi*, Nabscessins A and B, new aminocyclitol derivatives from *Nocardia abscessus* IFM 10029T, *Journal of Natural Products*, 80 (2), 565-568, 2017. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00935 査読あり
- ⑤ Jun Zhang, Hadi Gholami, Xinliang Ding, Minji Chun, CHrysoula Vasileiou, Tatsuo Nehira, Babak Borhan*, Computationally Aided Absolute Stereochemical Determination of Enantioenriched Amines, *Organic Letters*, 19, 1362-1365, 2017. DOI: 10.1021/acs.orglett.7b00246 査読あり
- ⑥ Shizuya Tanaka, Yuna Honmura, Shota Uesugi, Eri Fukushi, Kazuaki Tanaka, Hayato Maeda, Kenichi Kimura, Tatsuo Nehira, Masaru Hashimoto*, Cyclohelminthol X, a Hexa-substituted Spirocyclopropane from *Helminthosporium velutinum* yone96: Structural Elucidation, Electronic Circular Dichroism Analysis, and Biological

- Properties, *The Journal of Organic Chemistry*, 82 (11), 5574-5582, 2017. DOI: 10.1021/acs.joc.7b00393 査読あり
- ⑦ Felmer S. Latayada, Mylene M. Uy, Yui Akihara, Emi Ohta, Tatsuo Nehira, Hisashi Ômura, Shinji Ohta*, Ficusnotins A-F: Rare diarylbutanoids from the leaves of *Ficus nota*, *Phytochemistry*, 141, 98-104, 2017. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.05.016 査読あり
- ⑧ Yui Akihara, Emi Ohta, Tatsuo Nehira, Hisashi Ômura, Shinji Ohta*, New prenylated *ortho*-dihydroxycoumarins from the fruits of *Ficus nipponica*, *Chemistry and Biodiversity*, 14, e1700196, 2017. DOI: 10.1002/cbdv.201700196 査読あり
- ⑨ Yuriko Nagasaka, Shinpei Tanaka*, Tatsuo Nehira, Tomoko Amimoto, Spontaneous emulsification and self-propulsion of oil droplets induced by the synthesis of amino acid-based surfactants, *Soft Matter*, 13, 6450-6457, 2017. DOI: 10.1039/c7sm01117b 査読あり
- ⑩ Takeo Shimoyama, Mizuki Miyoshi, Tatsuo Nehira, Atsuko Motojima, Tsutomu Oikawa, Olivier Laurence, Yasuhiro Igarashi*, Two new secondary metabolites from a fungus of the genus *Robillarda*, *The Journal of Antibiotics* 17, 432-437, 2018. DOI: 10.1038/s41429-017-0015-x 査読あり
- ⑪ Yui Harauchi, Kyo Muranaka, Emi Ohta, Hiroyuki Kawachi, Aya Imamura-Jinda, Tatsuo Nehira, Hisashi Ômura, Shinji Ohta*, Sulfated Purine Alkaloid Glycosides from the Pupal Case Built by the Bruchid Beetle *Bruchidius dorsalis* Inside the Seed of *Gleditsia japonica*, *Chemistry and Biodiversity*, 15, e1800154, 2018. DOI: 10.1002/cbdv.201800154 査読あり
- ⑫ Yui Akihara, Sayuri Kamikawa, Yui Harauchi, Emi Ohta, Tatsuo Nehira, Hisashi Omura, Shinji Ohta*, HPLC profiles and spectroscopic data of cassane---type furanoditerpenoids, *Data in Brief*, 21, 1076-1088, 2018. DOI: 10.1016/j.dib.2018.10.068 査読あり

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 根平達夫, 伊藤弘音, 石原郁, 益田恵子, 浮穴和義, 松尾光一, 泉俊輔, 山崎岳, 石田敦彦「蛍光検出円二色性 (FDCCD) 分光法によるタンパク質立体構造解析の試み」第 11 回化学生態学研究会, 函館, 2016 年 7 月 1-2 日.
- ② 伊藤弘音, 根平達夫, 石原郁, 益田恵子, 浮穴和義, 松尾光一, 泉俊輔, 山崎岳, 石田敦彦「蛍光検出円二色性 (FDCCD) を利用した迅速かつ簡便なタンパク質高次構造解析の試み」日本生化学会大会, 仙台, 2016 年 9 月 25-28 日.
- ③ 紙川小百合, 太田恵美, 根平達夫, 大村尚, 太田伸二「ザウテルマメゾウムシ蛹室由来のフラノジテルペノイド類」TEAC2016, 東京, 2016 年 10 月 29-31 日.
- ④ 原内優衣, 村中恭, 紙川小百合, 太田恵美, 根平達夫, 大村尚, 太田伸二「マメゾウムシ蛹室由来の新規化学成分の構造と生理活性」第 59 回天然有機化合物討論会, 札幌, 2017 年 9 月 20-22 日.
- ⑤ 田中静也, 本村優奈, 前多隼人, 田中和明, 木村賢一, 上杉祥太, 福土江里, 根平達夫, 橋本勝「Cyclohelmentol X および Y の構造」第 60 回天然有機化合物討論会, 久留米, 2018 年 9 月 26-28 日.

- ⑥ 秋原由依, 紙川小百合, 原内優衣, 太田恵美, 根平達夫, 大村尚, 太田伸二「ジャケツイバラ種子内に寄生するザウテルマメゾウムシの代謝成分」第60回天然有機化合物討論会, 久留米, 2018年9月26-28日.
- ⑦ 村上綾菜, 林純一, 井川和宣, 堤美葵, 友岡克彦, 永井宏史, 根平達夫「海洋由来新規天然物 Dolapyrrolidone の絶対配置の決定」日本化学会中国四国支部2018年支部大会(愛媛大会), 松山, 2018年11月17-18日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 石田 敦彦

ローマ字氏名: Atsuhiko Ishida

研究協力者氏名: 渡辺 正行

ローマ字氏名: Masayuki Watanabe

※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。