

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19102

研究課題名(和文)高感度・高時間分解能を有する円二色性測定装置の開発と生体機能材料創製への活用

研究課題名(英文)Development of a circular dichroism measuring system with high sensitivity and high time-resolution and its application for creation of biofunctional materials

研究代表者

和田 健彦(Wada, Takehiko)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：20220957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質や核酸と小分子間の複合体形成過程の検出と解析は、基礎科学的観点からだけでなく、新規高効率生体機能制御材料開発の観点からも重要な研究テーマである。高効率で精度の高い分子開発には、複合体形成過程の動的挙動の直接的観察と解析が極めて重要であると考えられている。従来、動的挙動の直接的観察と解析には種々の時間分解スペクトル測定が適用されているが、特に円二色性(CD)スペクトル測定は、構造変化の動的挙動を高感度で検出可能で重用されてきた。しかし、S/N向上と時間分解能の向上が待望されてきた。

本研究では、楕円偏光を用いる新規検出法を検討し、高感度かつ高時間分解測定法としての展開に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発に成功した楕円偏光を用いるS/N向上と時間分解能の向上を達成した円二色性(CD)スペクトル測定法は、タンパク質や核酸と小分子間の複合体形成過程の動的挙動を高感度かつ高時間分解能で観測可能で、基礎科学への、そして新規生体機能材料開発などへの貢献が期待され、その学術的意義は大きく、今後社会実装が望まれている。

研究成果の概要(英文)：The detection of the complex formation process between biomolecules have received much attention not only basic scientific interest but also the development of biofunctional materials. Direct observation of the dynamic behavior of the complex formation process is considered to be important for highly efficient and accurate molecular development. Conventionally, various time-resolved spectral measurements have been applied to direct observation of dynamic behavior, but circular dichroism (CD) spectral measurement can detect the dynamic behavior of structural changes with high sensitivity. How to improve the low S/N originated from small CD peak intensities drawbacks of the CD measurement system was pointed out as a serious problem to be a general and powerful measurements tools. In this study, we have proposed and demonstrated the novel paradigm utilizing the elliptically polarized light as detection of the CD measurement system with high sensitivity and high time resolution.

研究分野：有機・生命物理化学

キーワード：円二色性 時間分解 楕円偏光 高感度 CDスペクトル 二重らせんDNA ポルフィリン誘導体 インターカレーション

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

円二色性(CD)スペクトル測定は、構造変化の動的挙動を高感度で検出可能で重用されてきた。CD スペクトルは、生体分子の絶対構造同定には最適な手法とはいえないが、構造変化の実時間観測には極めて高い感度を有し、有効な手法であると認識されている。さらにアキラルな小分子と生体高分子との複合体形成検出においては、小分子が複合体を形成する事により初めて検出される誘起 CD(ICD)ピークを指標として、バックグランドピークがない極めて高感度な検出が可能であり、一分子検出への展開も期待されるほど有効な方法論である。

しかし、左右の円偏光の吸収の差異である CD シグナルは、UV/Vis 測定における吸光度と比較し、一般に3桁以上シグナル強度が小さいために、高感度測定が困難である事も広く知られている。現行の CD 測定装置では、圧電・光弾性両効果・電気的共振を活用したストレスモジュレーター(SM)を用いることにより、この問題を解決している。ところが SM の電気的共振現象の動作周波数は 40KHz程度で有り、時間分解能は実用上ミリ秒程度が上限となり、短時間スケールでの構造変化の動的挙動解析には本質的の適用不可能であることが指摘されてきた。このため高感度と高時間分解能を両立可能な新規 CD 測定原理の開発が待望されてきた。しかし、SMを用いない信頼性の高い CD 測定手法の開発は極めて困難で、ほとんどの研究者は取組む事さえ諦めているのが現状であり、挑戦的研究(萌芽)として、申請する事が適切であると考えた。

2. 研究の目的

最近リボスイッチに代表されるように、生体高分子の構造変化が生体機能の調節制御に重要な役割を果たしている系が

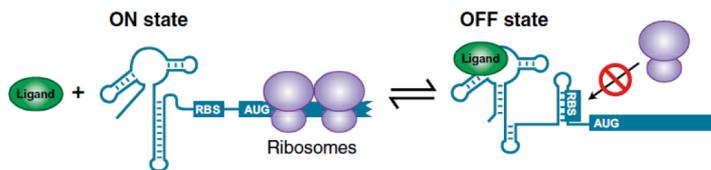


Fig.1 リボスイッチにおける基質結合に基づく翻訳機能スイッチのイメージ図.

多数発見され(図 1)、生体高分子の構造変化と機能調節機構との相関解明に注目が集まっている。特に核酸やタンパク質が、標的基質・小分子と結合する事により誘起される構造変化が、機能スイッチに直接寄与している系を中心に、構造解析ならびにその調節機構解明が精力的に研究されている。放射光を用いた X 線構造解析やクライオ TEM 法、さらには最新の NMR 測定等素晴らしい構造同定・解析手法が開発され、標的基質結合前後の生体高分子構造が多数決定・推定され、機能スイッチング機構の詳細が議論され、その理解が深まっている。

一方、タンパク質や核酸と小分子間の複合体形成過程の検出と解析は、基礎科学的観点からだけでなく、新規高効率生体機能制御材料開発の観点からも重要な研究テーマである。現在、生体分子を対象とした機能制御物質開発には、結合前後の構造同定と構造変化の比較検討、形成過程の速度論的、熱力学的解析に基づく検討が主流である。先に述べたように優れた構造同定法の開発、さらに詳細な速度論的、熱力学的検出・解析手法の開発により研究が進展しているが、より高効率で精度の高い生体機能制御材料開発には、複合体形成過程の動的挙動の直接的観察と解析が極めて重要であると考えられている。従来、動的挙動測定には時間分解 UV/Vis、蛍光スペクトル測定等種々の手法が適用されているが、なかでも円二色性(CD)スペクトル測定は、構造変化の動的挙動を高感度で検出可能で重用されてきた。CD スペクトルは、生体分子の絶対構造同定には最適な手法とはいえないが、構造変化の実時間観測には極めて高い感度を有し、有効な手法であると認識されている。さらにアキラルな小分子と生体高分子との複合体形成検出においては、小分子が複合体を形成する事により初めて検出される誘起 CD(ICD)ピークを指標として、バックグランドピークがない極めて高感度な検出が可能であり、一分子検出への展開も期待されるほど有効な方法論である。

しかし、現行 CD の時間分解能は高感度測定手法の原理的限界に基づきミリ秒程度で、マイクロ秒程度と予想されている早い複合体形成過程の検出には、本質的に適用不可能であり、根本的な解決課題を有している。このため高感度と高時間分解能を両立可能な新規 CD 測定原理の提案と測定装置の開発が切望されてきた。

3. 研究の方法

本研究では新規楕円偏光制御法に基づく高感度・高時間分解CD測定装置開発に取り組んだ。

(1) 楕円偏光活用による高感度・高時間分解CD検出法の開発：

楕円偏光を観測光とするCD測定法は、時間分解能の制約がない潜在的能力が高い極めて魅力的な系である。我々は信頼性の高い、新たな楕円偏光制御法による高感度検出法の開発を目指し、位相板の方位角を導入した新たな理論式を導出した。観測した左右楕円偏光強度 I_r 、 I_l から算出されるシグナル強度 S は、方位角を小さくすることで増大することが示された。シグナル強度 S の増大により、 S/N の向上、すなわち高感度検出が期待できる。本仮説に基づき、位相板の方位角を従来用いられてきた 90 度と -90 度から、本研究では $45 \sim 1$ 度 & $-45 \sim -1$ 度と大きく減少させ、シグナル強度 S の変化を検討する。位相板の方位角の制御は、位相板への加圧歪みに基づく位相遅れと比べ、位置再現性が高いため温度揺らぎなどの影響を受け難く、高い再現性が期待される。加えて位相板に大きな圧力を加え、位相板の方位角を小さくすることにより高感度検出が可能である事が理論式から示されており、複屈折の温度揺らぎの影響を受け難く、高感度と高い再現性を有する検出システムの構築が期待される。

(2) 高感度・高時間分解CDスペクトル測定装置を活用した生体機能材料開発：

構築した高感度・高時間分解能を有するCD測定システムを用い、キラルRu錯体により測定条件最適化ならびに市販CD測定装置との性能比較検討により概念実証実験に取り組む。概念実証実験に成功したシステムを用い、二重鎖DNA(dsDNA)・テトラピリジルポルフィリン誘導体(TPyP)複合体形成系の極初期過程の動的相互作用挙動解析を検討し、生体機能制御材料開発への適用可能性について検討する。dsDNAとTPyPは、1. インターカレーション、2. グループバインディング、3. サイドバインディングの3種類の複合体が報告されており、まず子牛胸腺DNA(ctDNA) および鯨精子DNA(hsDNA)を用い、dsDNAとTPyPを種々の割合で混合し、UV・VisならびにCDスペクトルやNMRを用い、相互作用を検討する。次にTPyPに光照射を行い、光励起により誘起されるdsDNAとTPyP複合体構造変化を蛍光スペクトル、蛍光寿命測定により詳細に検討する。さらに本研究で開発する高感度・高時間分解CD測定装置を用いた観測に取り組み、光照射後のdsDNAとTPyPとの複合体構造変化について検討する。高分子量でG-C含量高いctDNAと中分子量でA-TとG-C含量がほぼ均しいhsDNAとTPyPとの複合体構造ならびに光照射による構造変化を比較検討し、従来全く報告のない相互作用の極初期過程の有益な知見獲得が期待され、癌の光線治療薬新規開発戦略構築などにつながる成果の取得が期待される。

4. 研究成果

円二色性(CD)スペクトル測定は、構造変化の動的挙動を高感度で検出可能で重用されてきた。しかし現行CDの時間分解能は原理的にミリ秒程度で、 μ 秒程度の早い複合体形成検出には本質的な適用限界が指摘されている。このため高感度と高時間分解能を両立可

能な新規CD測定原理と測定装置の開発が切望されてきた。本研究では新規楕円偏光制御法に基づく高感度・高時間分解CD測定装置開発に取り組んだ。

(1) 本研究では、信頼性の高い、新たな楕円偏光制御法による高感度検出法の開発を目指した。位相板の方位角を導入した新たな理論式を導出し、実測される左右楕円偏光強度 I_r 、 I_l から算出されるシグナル強度 S は、方位角を小さくすることで増大することが示された。シグナル強度 S の増大により、 S/N の向上、すなわち高感度検出が期待できる。実際に位相板の方位角を、従来用いられてきた90度と-90度から、45~1度&-45~-1度と大きく減少させ、シグナル強度 S の変化を詳細に検討したところ、方位角を小さくすることにより、 S が増大することが明らかとなり、 S/N の向上、すなわち高感度検出が実現できることが明らかとなった。この方位角変化に基づく高感度観測法は、従来法に比較して温度揺らぎなどの影響を受け難く、高感度と高い再現性を有する検出システムの構築につながることを期待される。この成果に基づき、高感度・高時間分解CDスペクトル測定装置を活用した生体機能材料開発に取り組んだ。

(2) 構築した高感度・高時間分解能を有するCD測定システムを用い、キラルRu錯体により測定条件最適化ならびに市販CD測定装置との性能比較検討により概念実証実験に取り組み、本仮説が有効に機能することの証明に成功し、初期的知見を得た。

この初期的知見に基づき、構築した高感度・高時間分解能を有するCD測定システムを用い、キラルRu錯体により、測定システムのさらなる測定条件の最適化に取り組んだ。最適化されたシステムを用い、二重鎖DNA(dsDNA)・テトラピリジルポルフィリン誘導体(TPyP)複合体形成系の極初期過程の動的相互作用挙動解析を検討し、生体機能制御材料開発への適用可能性について検討した。dsDNAとTPyPは、1. インターカレーション、2. グループバイインディング、3. サイドバイインディングの3種類の複合体が報告されており、まず子牛胸腺DNA(ctDNA)および練精子DNA(hsDNA)を用い、dsDNAとTPyPを種々の割合で混合し、UV・VisならびにCDスペクトルやNMRを用い、相互作用を検討した。相互作用の検討に基づき、dsDNAにインターカレーションしたTPyPに対し光照射を行い、光励起により誘起されるdsDNAとTPyP複合体構造変化を蛍光スペクトル、蛍光寿命測定により詳細に検討した。これらの知見に基づき、本研究で開発した高感度・高時間分解CD測定装置を用いた光励起に伴うTPyP複合体の構造変化観測に取り組んだ。高分子量でG-C含量高いctDNAと中分子量でA-TとG-C含量がほぼ均しいhsDNAとTPyPとの複合体構造ならびに光照射による構造変化を比較検討した結果、ctDNAの場合は従来全く報告のない光照射に伴うTPyPの解離が観測され、相互作用の極初期過程の有益な知見の取得に成功した。この知見は今後癌の光線治療薬新規開発戦略構築などにつながると、その活用が期待されている。

以上、本研究では新規楕円偏光制御法に基づく高感度・高時間分解CD測定装置開発に取り組み、理論的再検討により位相板の方位角を導入した新たな理論式を導出した。この理論式に基づき高感度検出原理の可能性を見出し、新たな高感度測定法構築に向けた仮説を提案した。当初、技術的問題も含め、本仮説の実証実験には困難が伴うことを予想しており、実際の測定系構築、特に再現性良い方位角制御法の構築は容易ではなく、かなりの時間と労力を要した。しかし、新しい方位角制御プログラムを導入することにより、再現性良く、大きなシグナル強度 S の測定可能なシステム構築に成功し、当初予想・計画以上に進展したと評価され、本研究で開発ならびに実証に成功した測定原理を活用したCDスペクトル装置の社会実装が期待されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ui Mihoko, Miyauchi Yusuke, Inoue Masataka, Murakami Makoto, Araki Yasuyuki, Wada Takehiko, Kinbara Kazushi	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of an Engineered Photoactive Yellow Protein as a Cross Linking Junction for Construction of Photoresponsive Protein Polymer Conjugates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemPhotoChem	6. 最初と最後の頁 356 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cptc.201900024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inagaki Masahito, Uematsu Ryohei, Mizutani Tatsuya, Unabara Daisuke, Araki Yasuyuki, Sakamoto Seiji, Kashida Hiromu, Nishijima Masaki, Asanuma Hiroyuki, Inoue Yoshihisa, Wada Takehiko	4. 巻 48
2. 論文標題 N-Benzoyl-protected Peptide Nucleic Acid (PNA) Monomers Expand the Range of Nucleobases Available for PNA-DNA Chimera	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 341 ~ 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.181048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Makoto Kuronuma, Takehito Sato, Yasuyuki Araki, * Tadashi Mori, Seiji Sakamoto, Yoshihisa Inoue, Osamu Ito, and Takehiko Wada	4. 巻 48
2. 論文標題 3. Transient Circular Dichroism Measurement of The Excited Triplet State of Pristine Hexahelicene in Solution at Room Temperature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 357-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiromu Kashida, Hayato Kawai, Ryoko Maruyama, Yuta Kokubo, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Hiroyuki Asanuma	4. 巻 1
2. 論文標題 Quantitative evaluation of energy migration between identical chromophores enabled by breaking symmetry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Chemistry (Nature)	6. 最初と最後の頁 91-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-018-0093-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato, Daiki; Sakai, Hayato; Araki, Yasuyuki; Wada, Takehiko; Tkachenko, Nikolai V.; Hasobe, Taku	4. 巻 20
2. 論文標題 5. Concentration-dependent photophysical switching in mixed self-assembled monolayers of pentacene and perylene diimide on gold nanoclusters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 8695-8706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8CP00174J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kashida Hiromu, Azuma Hidenori, Maruyama Ryoko, Araki Yasuyuki, Wada Takehiko, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 59
2. 論文標題 Efficient Light Harvesting Antennae Resulting from the Dense Organization of Dyes into DNA Junctions through D-Threoninol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202004221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Bihai, Wada Takehiko, Yabu Hiroshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Underwater Bubble and Oil Repellency of Biomimetic Pincushion and Plastron-Like Honeycomb Films	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c00427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekizawa Yu, Mitomo Hideyuki, Nihei Mizuki, Nakamura Satoshi, Yonamine Yusuke, Kuzuya Akinori, Wada Takehiko, Ijiri Kuniharu	4. 巻 2
2. 論文標題 Reversible Changes in the Orientation of Gold Nanorod Arrays on Polymer Brushes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0NA00315H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ghidinelli Simone、Abbate Sergio、Koshoubu Jun、Araki Yasuyuki、Wada Takehiko、Longhi Giovanna	4. 巻 124
2. 論文標題 Solvent Effects and Aggregation Phenomena Studied by Vibrational Optical Activity and Molecular Dynamics: The Case of Pantolactone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 4512 ~ 4526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c01483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takehiko WADA
2. 発表標題 Development of high sensitive and high time-resolve circular dichroism (CD) measurement system
3. 学会等名 Advances in Noncanonical Nucleic Acids 2019 (ANNA2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiko WADA
2. 発表標題 Synthesis of Intracellular Condition Responsive Artificial Nucleic Acids for the Catalytic Oligonucleotide Therapeutics
3. 学会等名 6th Annual Joint Data Science in Life Science and Engineering Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田健彦
2. 発表標題 細胞内環境応答型人工核酸システムの開発 ヌクレアーゼ活性制御機能を有する癌細胞選択的核酸医薬創製を目指して
3. 学会等名 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 第3回機能性分子化学フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田健彦
2. 発表標題 弱い相互作用を協働的に活用した不斉光反応制御 生体高分子をキラル反応場として活用した超分子不斉光反応系を中心として
3. 学会等名 第40回光化学若手の会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田健彦
2. 発表標題 天然ヌクレアーゼ活性超越に資するDNA-人工核酸キメラ分子構造設計と機能評価
3. 学会等名 第68回高分子討論会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiko WADA
2. 発表標題 Development of Cancer Cell-Specific Oligonucleotide Therapeutics Delivery System with MMP Activatable PEG-Conjugated Oligoarginine Peptides
3. 学会等名 FIBER International Summit for Nucleic Acids 2018 (FISNA-2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takehiko WADA
2. 発表標題 Supramolecular Asymmetric Photochirogenesis (SMAP) of 2-Anthracene Carboxylate and 2,6-Anthracene Dicarboxylate mediated by Serum Albumin as Chiral Reaction Nanoreactor - Utilizing a Dynamics of Photoexcited Molecule for New Type of Asymmetric Photoreaction -
3. 学会等名 Special Lecture of University de Bordeaux. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takehiko WADA
2. 発表標題 Supramolecular Asymmetric Photochirogenesis (SMAP) of 2-Anthracene Carboxylate mediated by Serum Albumin as Chiral Reaction Nanoreactor
3. 学会等名 Special Lecture of Technische University Munchen. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田健彦
2. 発表標題 細胞内環境応答型人工核酸の開発 -イスキミア(虚血)細胞選択的核酸医薬の創製を目指して-
3. 学会等名 東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター講演会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田健彦
2. 発表標題 タンパク質キラルキャビティを活用した新規分子結合制御法の創成
3. 学会等名 第67回高分子討論会(招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮田隆志監修; 和田健彦、片岡一則、石原一彦、浅沼浩之、伊藤耕三、中條善樹、秋吉一成、原田明、上垣外正己、大塚英幸、浜地格、有賀克彦、丸山厚、大矢裕一、古川英光、佐藤尚弘、柴山充弘、田中敬二、前田瑞夫、他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 864
3. 書名 刺激応答性高分子ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----