

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19408

研究課題名(和文)疎水性短冊形分子の水溶性ナノカプセル封入新手法：蛋白質の動的核偏極NMRへの応用

研究課題名(英文) New method for tanzaku-shape molecule encapsulation: application to dynamic nuclear polarization NMR of proteins

研究代表者

樋口 恒彦(Higuchi, Tsunehiko)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授

研究者番号：50173159

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)：本研究は、優れた分子構造の解析法であるが感度は低いNMR分光法の感度を飛躍的に高める新しい手法である動的超偏極法(DNP)を、タンパク質など水溶性生体分子の分析に生かせるようにするための取り組みである。具体的にはDNPに有用であるが極めて疎水的な分子ペンタセン(Pc)を、複数のグルコースが環状化したシクロデキストリン(CyD)の誘導体を設計・合成して包接させる検討を行った。その結果、Pcの疎水表面を包み込むサイズを有し、表面を親水基だけとすることのできる、2つのCyDを架橋した分子の合成に成功した。さらに、PcとCyDとの間で共有結合を形成して水溶性となる分子の合成を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動的超偏極法(DNP)は、核磁気共鳴分光法(NMR)の欠点である測定感度の低さを大きく補う優れた手法である。ただし、DNPの促進に優れた機能を有するペンタセンは極度に疎水的であるため、測定に時間のかかるタンパク質などの水溶性分子には応用できなかった。このペンタセンを水溶化して上記目的にかなわせるために、ペンタセンの形状分子の包接に適した内腔を有する水溶性分子の合成を行った。今後この分子に適したペンタセン誘導体を包接させることで、タンパク質などの構造解析の大幅効率化に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：This work aims application of dynamic nuclear polarization NMR to observe water soluble biomolecules such as proteins with ultrahigh sensitivity by developing water soluble DNP-enhancing molecules. A DNP-enhancing pentacene is a extremely hydrophobic molecule with no water solubility. We developed a two water-soluble cyclodextrins-linked molecule with inner space for appropriate pentacene inclusion and hydrophilic surface. We next examined preparation of a pentacene that two cyclodextrins are covalently bound by using Click reaction.

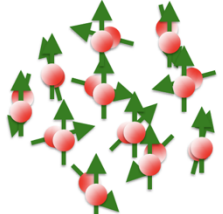
研究分野：生物有機化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：シクロデキストリン 動的核偏極 ペンタセン 包接 NMR 水溶化

1. 研究開始当初の背景

NMR 分光は、対象分子について様々な詳細で優れた情報をもたらす極めて重要な分光法であるが、欠点としては感度が低いということが主に挙げられる。これは通常では、強磁場中においても核スピン軸の整列度「核偏極」が極めて低いことによるところが大きい。一方、ラジカルなどの電子スピンはその共鳴周波数の高周波をかけることでほぼ 100%の電子スピン偏極が起き、それが周囲の多数の分子の核偏極を引き起こすことがわかってきた。これにより NMR の感度を飛躍的に高められる。従来は嵩高い有機ラジカルを用いた報告例がある。

NMRの信号源
 =核スピン軸の整列度「核偏極」
 常温,3テスラで ~ 0.00001
DNP: 核偏極を増大させる手法
 → 10—10000倍増大

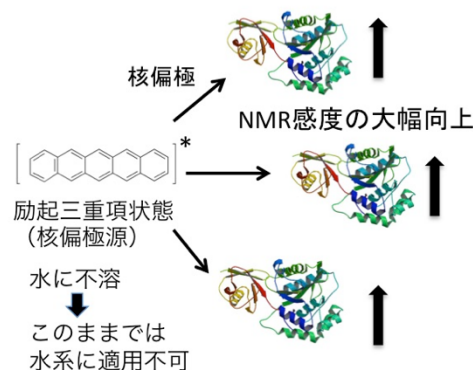


近年になって、ペンタセンおよびそのアナログは、光励起により一つの励起三重項状態になり、それが周囲の多数の分子の核偏極（動的核偏極：DNP）を引き起こし、室温でそれらの NMR の感度を数万倍まで高めるといふ、驚くべき機能を有することが研究開始以前に報告された (Kitagawa et al., *PNAS*, 2014, *III*, 7527)。

もしタンパク質の構造解析に応用できれば、通常何日もかかる測定をわずか極短時間で終了させる超迅速測定法につながり、意義は大きい。しかしながら、ペンタセン類は高度に疎水的で、通常の修飾で水溶化は構造上困難であり、当時の状況では応用不可能であった。

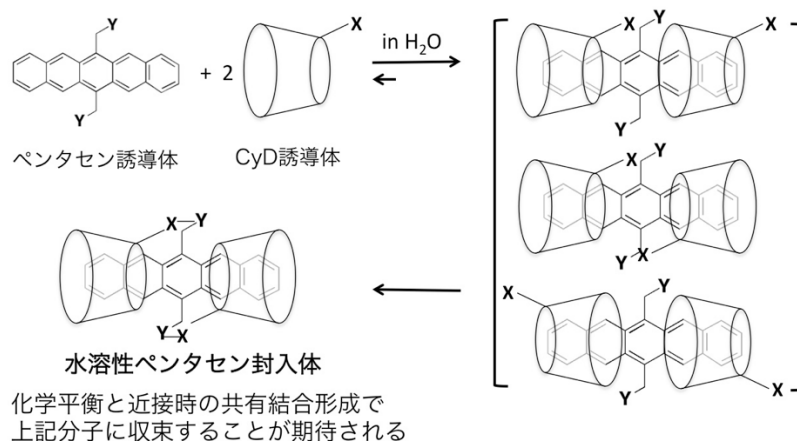
2. 研究の目的

シクロデキストリン(CyD)への疎水性分子の包接はよく知られている水溶化法である。よい例としてフラレン(C₆₀)がγ-CyD 2分子で包接され水溶化できる研究例がある。可逆的包接では、疎水性部位も有するタンパク質への分配により包接が破綻するため、不可逆的な封入の必要がある。ここで動的平衡合成法を応用して、効率よくホストゲスト間で共有結合を形成し不可逆な封入を2つのCyDで行う新たな手法を着想した。光に不安定なペンタセンの安定化も同時に見込まれ、初めての水溶化安定化ペンタセンを合成する。これを用いた動的核偏極による、微量のタンパク質や極微量の糖鎖などの水溶性分子の NMR 測定を種々実施し、極度に迅速な NMR 構造解析新手法への道を拓くと考えた。



3. 研究の方法

(1) ペンタセンを標的分子とし、ペンタセンを修飾した分子をまず合成し、以下のように2つのCyDによる包接と、近接時に初めて共有結合を形成するようにして導くことで、ペンタセンを不可逆的に封入する分子形に収束させる反応を実施するとした。また、最初からペンタセン誘導体とCyD誘導体との間に共有結合を形成させ、包接が起きて水溶性を持たせることができるかどうか

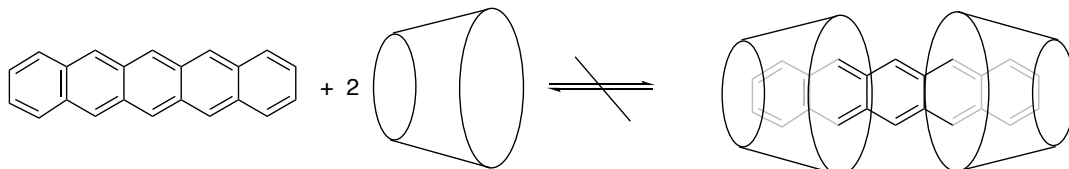


についても平行して検討する。包接が起きたときに、ペンタセン構造の安定化がどの程度なされているかを評価する。ある程度の安定性が確認できた後、重水溶媒中で実際 DNP を起こすことが

できるかどうかを検証していく。

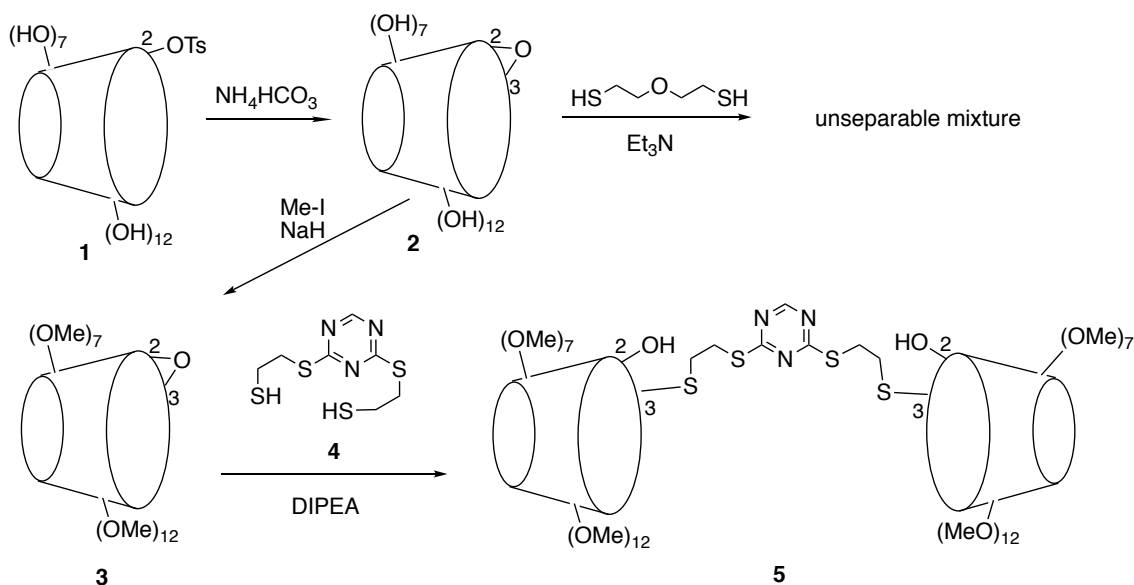
4. 研究成果

- (1) 非常に疎水性の高い芳香族であるフラレーン(C₆₀)は、通常水に全く不溶であるが、 γ -CyDと混合し力学的に包接を起こさせ、水溶性化できることが知られている。そのためまず、同様にペンタセンと β -CyDとを固相で力学的に包接を起こさせることを混合物を乳鉢でグラインドして包接化を試み、混合物を水中に加えてペンタセンの青色が水溶液として見られるかどうかを検討したが、いくつかの検討でも包接は確認できなかった。これは、フラレーンが球状のため、フラレーン同士の接触面積が小さく相互作用が小さいため、 γ -CyDの包接に導くことができたが、ペンタセン同士は広い π 平面同士のため、相互作用



用が大きく β -CyDで引き離すには至らなかったと考えられた。

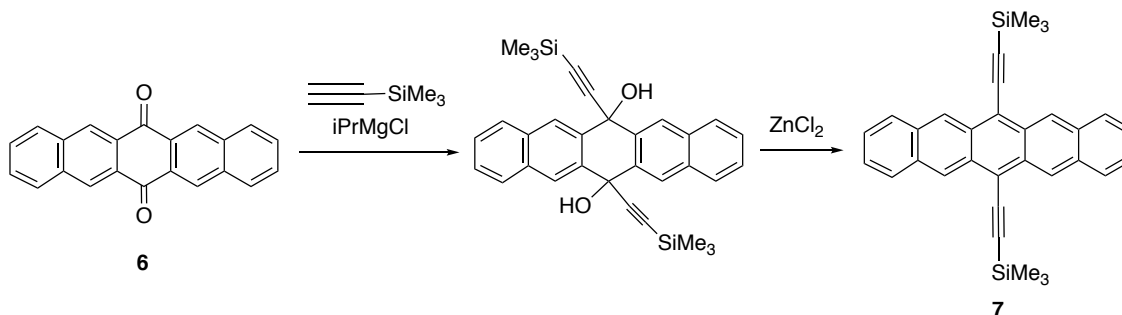
- (2) 上記の結果から、 β -CyD単分子では、ペンタセンの結晶からペンタセン単分子を引きはがすためには、ペンタセンを受け入れる相互作用が不十分と考えられた。そのため、より相互作用する面積がかなり大きく、形もペンタセンが収まる「鞘」となる、包接により適したと考えられる構造の化合物を以下のように合成した。



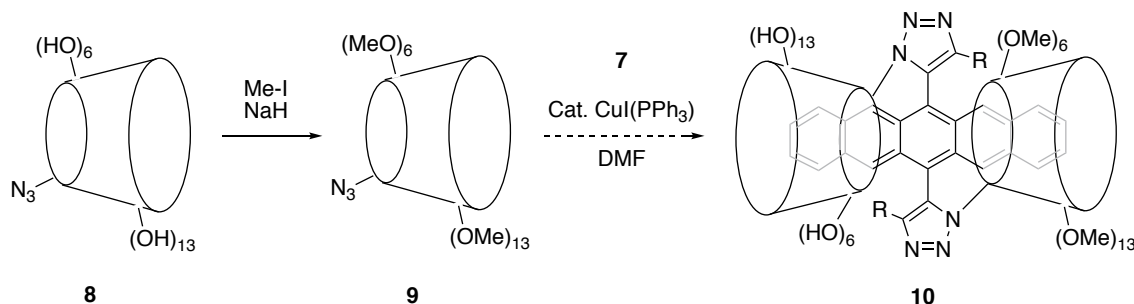
市販の化合物 **1** から文献既知の方法でエポキシ体 **2** に導き、これを上図上段のエーテル結合を持つジチオールで架橋することにより、ペンタセンのホストの合成を試みた。しかし、多数の水酸基を有する化合物を分離精製しようとしても、通常の有機化学で用いる操作では行うことができず、また UV 吸収も持たないことから、HPLC 分離も行えなかったため、方針を変えることとした。**2** の水酸基をすべてメチル化した **3** であれば、シリカゲルカラムなど通常の有機化学的操作で分離精製が行えるという報告 (加納、北岸ら *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 435-438) があったため、水酸基をメチル化して進めることとした。

エポキシ体 **2** をパーメチル化することによりエポキシ体 **3** を得た。また、2分子の **3** の架橋を行うジチオールについても改良し、水溶性を考慮しつつ UV 吸収性を保有させた新規なジチオール **4** を開発した。トリアジン環の窒素原子は水からの水素結合のアクセプターとなるため、水中でその部分により凝集を引き起こさないと考えて分子を設計した。このジチオール **4** による CyD 誘導体 **3** の架橋を行い、精製を経て二量体 **5** の合成を行った。**5** は現在のところ少量しか得られておらず、これを用い、ペンタセンとの複合体について、グラインドによる物理的複合体化や混合溶媒系での混合を経ての複合体を試みたが、現在のところ明確に包接が行えたことを表す結果は得られていない。

- (3) これまでの結果から無置換のペンタセンそのものでは、ペンタンセン間の相互作用が強すぎ、複合体化には不利と考えられたため、置換基を有するペンタセンを用いることとした。また、CyD と共有結合を形成させて強制的に複合体化を行うことに方針を変更した。共有結合を作る方法としては、ペンタセンと β -CyD との間で共有結合を容易に形成させるために Huisgen の 1, 3-双極子付加反応の中でもクリック反応として汎用されているアジド基とアルキンとの環化反応を応用することとした。ペンタセンの中央部に二つのアルキンを導入した置換ペンタセン **7** は、市販の **6** から 2 段階で合成した。次に **7** のトリメチルシリル基を除去しようと Bu_4NF と反応させたが、反応途中から後処理にかけてペンタセンの濃青色が脱色していった。このことはペンタセンの共鳴系が失われたことを示すため、**7** のまま次に用いることとした。



次に、アジド基を置換基に持つ β -CyD の合成に関しては、最近になって **8** が市販されていることを知ったため購入し、これをパーメチル化して **9** を得た。こうして得られた **7** と **9** との間でクリック反応を行った。触媒は $\text{CuI}(\text{PPh}_3)$ を用いた。反応は窒素雰囲気下 80°C で行ったが、時間と共に色調が濃青色から濃い鶯色に変化していった。反応混合物の分離精製を分子量の違いや分子の形状の違いで分離できる、穏やかな分離法である GPC で分離を試みたが、どのフラクションにも濃青色を示すところは確認できず、この場合もまた反応・精製過程でペンタセンの共鳴系が失われたことを示す結果となった。

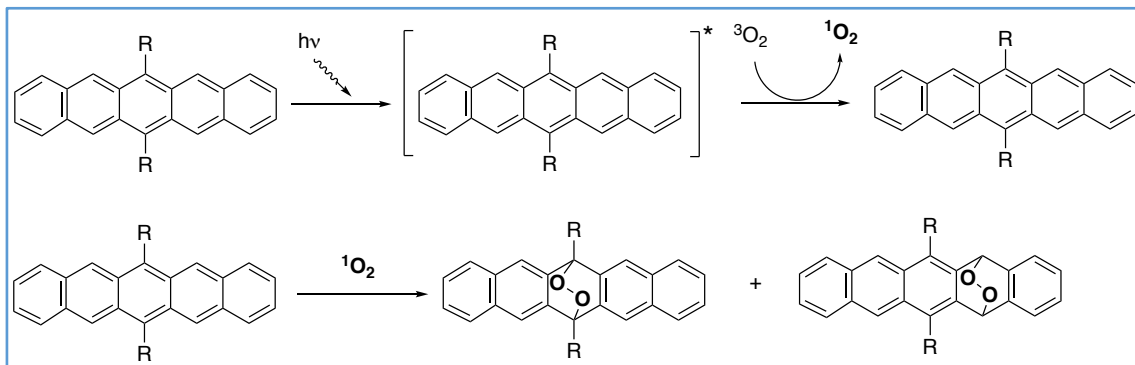


反応としては銅触媒を用いてきたが、反応様式からは無触媒の熱反応の方が適しているとも考えられたため、その条件を含め種々の反応条件の検討を現在も行っている。

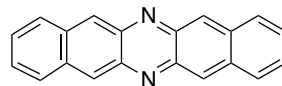
考察

本研究は、水溶性を持たず溶液状態で不安定なペンタセン及びその誘導体を、CyD 誘導体により包接させて、ペンタセンに水溶性と安定性の両方を付与させられると着想し、スタートしたものである。当初しばらくは、CyD 類の扱いが通常の有機化合物とかなり異なり、扱いにくかったことから、担当した学生の実験が思うようにはなかなか進まなかった。このことに加えて、新型コロナウイルスの感染拡大による緊急事態宣言発令に伴い学生に登校を行わせない期間や実験時間の短縮期間があったことなどにより、研究の進展にはかなりの遅延が生じた。

ペンタセンを用いる動的超偏極法は、極低温を用いなければならない他の超偏極法と比較し、室温で行えるという大きなメリットを持っている。一方で、ペンタセンは次図に示すように、照明の可視光で容易に励起され、その励起三重項状態が酸素分子を励起して一重項酸素を生じ、ペンタセン自身と[4+2]環化付加反応を起こすことにより、ペンタセン構造が失われると考えられる。実際に扱ってみて、予想より遙かにこの反応が起きやすく、後処理中に分解していくことが研究遂行の非常に大きな妨げとなった。ペンタセンの 6 位と 13 位にアルキンを導入した化合物 **7** ではさらにこの反応が起きやすくなったと感じている。これは、6 位と 13 位に電子供与性の置換基が導入されたことで一重項酸素との反応がさらに起きやすくなったことや、導入により π 電子共鳴系が広がったことでさらに長波長の光でも励起されるようになったことなどが考えられる。このため、置換基 R に関しては、電子求引性のものを用いることで一重項酸素との反



応を抑えることや、共鳴しないものを用いることが必要であると考えている。また一方、以下の6,13-ジアザペンタセンにもペンタセンと同様の動的核偏極を起こす能力があり、一重項酸素と反応しにくい安定性も有しているという報告に最近気がついた(*J. Phys. Chem. Lett.* 2019, 10, 2208–2213)。このため、今後はこの6,13-ジアザペンタセンの誘導体を合成し、CyD との包接を行わせる方法が行いやすく有望と考えて進めている。



さらに、最近になって、CyD 誘導体と鉄ポルフィリンとの複合体を合成しそれを用いた優れた研究を行っている専門家である同志社大学の北岸宏亮教授と共同研究を行うこととなり、サンプルの提供や実験に関する詳細な情報提供をいただいて急ピッチで研究を進めているところである。本科研費における研究期間は終了したが、これまでの経験も生かしつつ、今後も本研究を進めていく所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|