

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 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：2021～2022
課題番号：21K18992
研究課題名(和文) 生体高分子の動的挙動解明と機能材料への展開に資する高感度時間分解CD測定装置開発

研究課題名(英文) Development of high-sensitivity time-resolved CD measuring system for elucidation of functional biopolymers dynamics

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：円二色性(CD)スペクトル測定は、キラル分子系の構造変化を高感度で検出可能で多用されているが、現行CDの時間分解能は原理的にm秒程度で、 μ 秒程度の高時間分解能と高感度を両立可能な新規CD測定原理と測定装置開発が切望されてきた。本研究では研究協力者の荒木保幸准教授の発案した楕円偏光を検出光として用いる新規検出法を活用した高感度・高時間分解CD測定装置開発に取り組み、方位角変化に基づく高感度・高時間分解観測法が有効に機能することを実証した。さらに本研究で構築した過渡CD測定法により、室温・溶液中における有機分子の励起三重項状態のCDスペクトルを測定可能であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

左右の円偏光吸収の差異であるCDシグナルは、シグナル強度が小さいため高感度測定が困難である事も広く知られ、SMを用いることで本課題を解決しているが、時間分解能はミリ秒程度が上限である。このため高感度と高時間分解能を両立可能な新規CD測定原理の開発が待望されてきた。本研究では荒木准教授が提案した新規楕円偏光制御法に基づく高感度CD検出装置の構築に取り組み、方位角変化に基づく高感度・高時間分解観測法が有効に機能することを実証した。さらに本研究で構築した装置により、室温・溶液中で有機分子の励起三重項状態のCDスペクトルを測定可能であることを実証し、その波及効果は極めて大きいと評価されている。

研究成果の概要(英文)：Circular dichroism (CD) spectroscopy is widely used to detect structural changes in chiral molecular systems. However, the time resolution of current CD spectrometers is limited to m-sec order because of the utilization of the PEM. To observe more fast events of chiral molecules, it has been desired to develop a novel CD measurement system that can achieve both high sensitivity and high temporal resolution of micro-sec order. In this study, we have developed a CD measurement system with high sensitivity and time resolution by utilizing a new detection method using elliptically polarized light, which was proposed by our collaborator Assoc. Prof. Yasuyuki Araki, and demonstrated that the high sensitivity and high time-resolution observation method based on azimuthal change works effectively. We also have demonstrated that the transient CD measurement method developed in this study can measure the CD spectra of excited triplet states of organic molecules in solution at room temperature.

研究分野：有機光化学、生体機能関連化学、核酸化学

キーワード：CDスペクトル 楕円偏光 方位角制御 円偏光二色性 高感度測定 三重項 過渡吸収 高時間分解

1. 研究開始当初の背景

近年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多数発見され、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 EM 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性分子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性分子開発には、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・設計が主流である。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性分子開発には、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、バックグラウ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 測定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。

上記のように CD スペクトル測定は、生体に近い低濃度溶液状態で、比較的高感度で構造変化の動的挙動を検出可能な測定法として注目されている。CD 測定法は、①キラルな生体(高)分子の構造変化を高感度に検出可能、②標識化が不要で幅広い試料適用範囲、③(生理条件下に近い)低濃度溶液で測定可能等優れた特徴を有し、さらに種々の分子が混在する夾雑系においても④キラリティーを有する分子・分子集合系をバックグラウンドフリーで選択的に検出可能である等、他の測定法にはない利点を有している。

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・電氣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 の電氣的共振現象の動作周波数は 50kHz 程度で、時間分解能はその逆数のミリ秒程度が上限となり、構造変化の動的挙動解析には本質的に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。

これらの背景を踏まえ、高時間分解能測定を指向した種々の CD 測定法が報告されてきたが、楕円偏光を観測光源として用いる Kligler らの研究は一般性を有し、ナノ秒スケールでの CD 測定を行った先

駆的な研究として高く評価されている。しかし、彼らの方法論は、彼ら自身が指摘しているように極微小加圧した石英プレートに生じる、極僅かな複屈折に基づく楕円偏光を観測光として用いるため、複屈折の温度揺らぎ等外部環境変化により大きく影響を受け、再現性に乏しいといった本質的で、かつ重大な問題を抱えているため、一般的な手法とは成り得ていなかった。

2. 研究の目的

本研究では研究協力者である東北大学多元物質科学研究所 荒木保幸准教授が提案した新規楕円偏光制御法に基づく高感度 CD 検出法の構築を目指し、さらに構築した高感度検出法を活用し、時間分解 CD 測定装置開発への展開を目指した。

具体的には楕円偏光活用による高感度・高時間分解 CD 検出法の開発、構築した楕円偏光観測 CD 測定システムを用い、検出感度を市販 CD 測定装置の検出感度と比較検討し、さらに再現性について詳細に検討の後、装置セットアップと測定条件の最適化を行い、さらなる高感度化と高時間分解測定への展開に関する概念実証実験に取り組んだ。

本研究では概念実証実験に成功したシステムを用い、核酸やタンパク質と小分子の複合体成形など複雑系の動的挙動解析に先立ち、まずキラル Ru 錯体標準溶液での概念実証実験に取り組んだ。次に高い三重項生成量子収率 ($\phi_T = 0.91$) を有する $[n]$ carbohelicenes ($[n]$ CHs, $n = 6, 7, 9$) を測定試料として選択し、過渡吸収測定装置を本研究で構築した過渡 CD 測定装置に導入し、室温・溶液中における励起三重項状態の $[n]$ CH* の吸収及び CD スペクトルの測定にも取り組み、密度汎関数法を用いた量子化学計算によって得られた理論スペクトルとの比較を行う事により、得られたスペクトルの妥当性ならびに本研究で構築した楕円偏光制御法に基づく高感度・高時間分解 CD 検出装置の信頼性の実証にも取り組んだ。

3. 研究の方法

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。荒木准教授は、温度依存性が少なく信頼性の高い、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(式1)。

$$\Delta\varepsilon = S \cdot \sin 2\theta \frac{\tan \frac{\delta}{2}}{1.15cl} \left(S = \frac{I_r - I_l}{I_r + I_l} \right) \dots (1)$$

$\Delta\varepsilon$, c , l はそれぞれ、サンプルのモル円二色性、濃度、光路長を示し、 θ , δ は位相板の方位角、位相遅れを示す。また S は観測した左右楕円偏光強度 I_r , I_l から算出される。式1から方位角 ($\sin 2\theta$) を小さくすることで S の増大、すなわち高感度検出が期待できる。方位角は位相遅れと比べ位置再現性が高いため温度揺らぎによる影響を受け難く、加えて位相板に大きな圧力を加え、大きな位相遅れを発生させても高感度検出が可能なため、

Kliger らの手法で問題となっていた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。

本研究で構築した楕円偏光観測 CD 測定システムを用い、キラル Ru 錯体標準溶液の初期的測定を

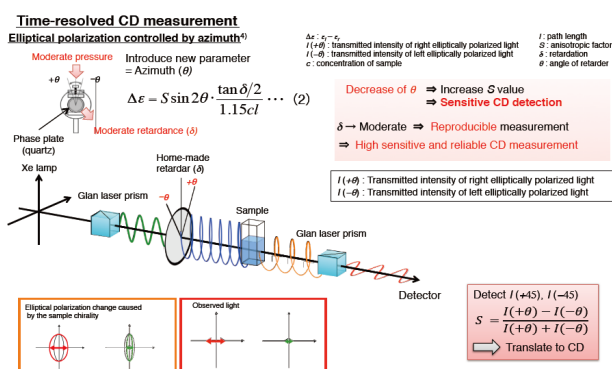


図.1 新規高感度高時間分解 CD 測定原理の概念図。

行い、市販 CD 測定装置より約 20 倍高感度である事を見出した。装置セットアップと測定条件の最適化により、さらなる高感度化と高時間分解測定への展開に関する概念実証実験にも取り組んだ。

具体的には本研究で構築し、キラル Ru 錯体標準溶液により概念実証実験に成功した測定システムを用い、高い三重項生成量子収率 ($\phi_T = 0.91$) を有する $[n]$ carbohelicenes ($[n]$ CHs, $n = 6, 7, 9$) を測定試料として選択し、過渡吸収測定装置と融合し、室温・溶液中における励起三重項状態の $[n]$ CH* の吸収及び CD スペクトルの測定に取り組んだ。並行して密度汎関数法を用いた量子化学計算 TD-DFT(UCAM-B3LYP /6-31G(d,p))による光励起励起三重項状態 $[n]$ CH* ($n=6,9$)の理論計算 CD スペクトルの取得にも取り組んだ。得られた理論スペクトルとの比較を行う事により、得られたスペクトルの妥当性ならびに本研究で構築した楕円偏光制御法に基づく高感度・高時間分解 CD 検出装置の信頼性の実証にも取り組んだ。

4 . 研究成果

当研究室荒木准教授研究協力者は、楕円偏光検出系の位相板に方位角を導入した上記 式-1に示す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、増大したシグナル強度 S により S/N の向上、その結果高感度検出が期待できることを見出した。

実際にキラル Ru 錯体標準溶液を用い、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 ~ 2 度、- 45 ~ 2 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、方位角減少に伴い S 値が増大し、その結果 S/N の向上・高感度検出が実現可能であることを実証した。この方位角変化に基づく高感度観測法は、従来法に比較して高い再現性を有し、高感度・高時間分解 CD 測定装置開発につながる事が期待される。

次に構築した楕円偏光検出 CD 測定システムを用い、実サンプルによる高時間分解ならびに高感度 CD スペクトル測定に挑戦し、新規楕円偏光制御法に基づく高感度 CD 検出法の概念実証試験に取り組んだ。

近年、光励起状態を活用した研究が広がりを見せている。特に、励起一重項分子から励起三重項二分子が生成する過程である一重項分裂¹は、Shockley-Queisser 限界を超える太陽電池の開発につながる事期待されている。また、三重項-三重項対消滅を用いたフォトアップコンバージョン過程²は、低いエネルギーの光を高エネルギー光への変換を達成可能である。そのため、有機分子の励起状態研究の重要性は高まっている。一般的に、励起状態の研究において、過渡吸収測定法が広く使用されており、励起状態のダイナミクス解析などの数多くの研究例が報告されている。しかしながら、過渡吸収法では分子配向や分子間の相互作用の情報を得ることは困難であるという問題点がある。

仮に、CD 測定法を励起状態の分子へ適用することが出来れば、過渡吸収測定法では困難な励起状態の分子の構造や相互作用の解析が可能になると期待されるが、上記のように市販の CD スペクトル測定装置の時間分解能は数十ミリ秒程度に制限されている。そのため、一般的に励起状態の数十マイクロ秒の寿命の励起状態の分子には適用不可能である。

このような背景を踏まえ本研究で構築した過渡 CD 測定装置を用いて、有機分子の励起三重項状態の CD スペクトル測定に挑戦した。

測定対象分子としては、高い三重項生成量子収率 ($\phi_T = 0.91^3$) を有する $[n]$ carbohelicenes ($[n]$ CHs, $n = 6, 7, 9$) を選択した。本研究では、過渡吸収測定装置及び構築した過渡 CD 測定装置を用いて、室温・溶液中における励起三重項状態の $[n]$ CH* の吸収及び CD スペクトルの測定を行った。さらには、密度汎関数法を用いた量子化学計算によって得られた理論スペクトルとの比較を行った。

既知法に基づき、(rac)-[9]CH を合成し、キラルカラムを用いた HPLC による光学分割により (*P*) 体及び (*M*) 体のエナンチオマーを高純度で得た。

はじめに励起三重項状態の $[n]$ CH ($^3[n]$ CH*) の吸収帯を明らかにするために、過渡吸収スペクトルを測定したところ、 $^3[n]$ CH* の吸収 (T-T 吸収) が観測された。続いて、構築した過渡 CD 測定装置を用いて光励起後 1-11 μ s での $^3[n]$ CH* ($n = 6, 9$) の CD スペクトルを測定したところ、T-T 吸収に対応する正のコットン効果を有するミラーイメージの CD スペクトルが得られた。(図 3 では [9]CH のみ示す。)

この得られた $^3[n]$ CH* の吸収及び CD スペクトルと TD-DFT (UCAM-B3LYP / 6-31G(d,p)) を用いた量子化学計算の結果と比較したところ、吸収帯及び CD 符号共にいずれも良い一致を示した。以上の結果より、構築した過渡 CD 測定法は室温・溶液中における有機分子の励起三重項状態の CD スペクトルを測定できることが明らかとなった。

以上、本研究では研究協力者である東北大学多元

物質科学研究所 荒木保幸准教授が提案した新規楕円偏光制御法に基づく高感度 CD 検出法の構築を目指し、キラル Ru 錯体標準溶液を用いた測定によりその有効性の実証に成功した。さらに過渡吸収測定装置及び構築した過渡 CD 測定装置を用いて、室温・溶液中における励起三重項状態過渡 CD スペクトル測定にも挑戦し、極めて良好な S/N で信頼性高い鏡像関係にある過渡 CD スペクトル測定にも成功し、新規楕円偏光制御法に基づく高感度 CD 検出法の構築に成功した。

今後、マイクロ秒の時間分解能を有する過渡 CD 測定システムを用い、生体高分子の構造変化や複合体形成過程の動的挙動直接的観察・解析に展開していきたい。

参考文献

- (1) Johnson, J. C.; Nozik, A. J.; Michl, J. *Chem. Rev.* **2012**, *110*, 6891–6936.
- (2) Gray, V.; Dzebo, D.; Lundin, A.; Alborzpour, J.; Abrahamsson, M.; Albinsson, B.; Moth-Poulsen, K. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3*, 11111–11121.
- (3) Sapir, M.; Donckt, E. Vander. *Chem. Phys. Lett.* **1975**, *36* (1), 108–110.

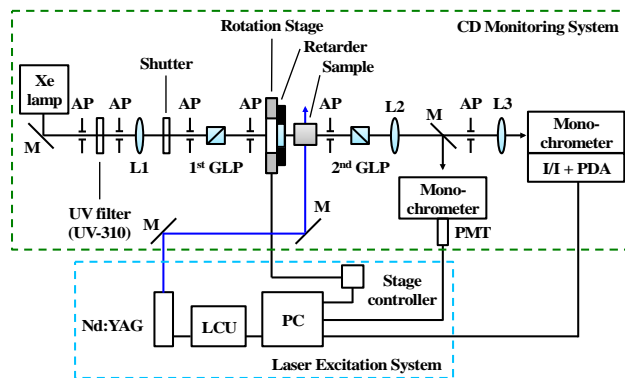


図 2 新規高感度高時間分解過渡吸収 CD 測定。L1, L2, L3: Lens, AP: Aperture, GLP: Glan laser, M: Mirror, I/I+PDA: Image intensifier + Photodiode array, PC: Personal computer, LCU: Laser control unit, Nd:YAG: Nd:YAG laser

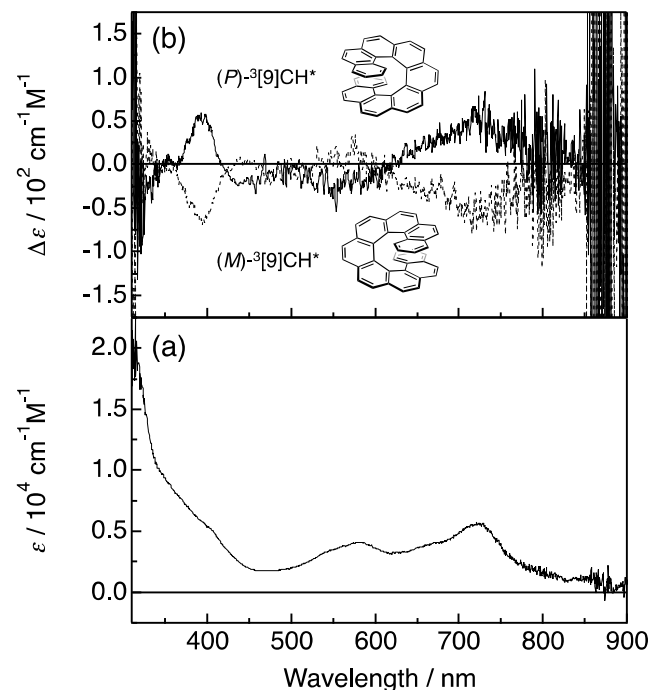


図 3. (a) Absorption spectrum of (rac)-[9]CH* in toluene at RT. (b) CD spectra of (*P*)- (solid line) and (*M*)-[9]CH* (dashed line) in toluene in RT.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakurayama Yukari, Onodera Tsunenobu, Araki Yasuyuki, Wada Takehiko, Oikawa Hidetoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Random laser oscillation from an organic fluorescent dye loaded inside a porous zirconia medium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 32030 ~ 32037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1ra05791j	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 9
2. 論文標題 Amphiphilic Perforated Honeycomb Films for Gravimetric Liquid Separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Materials Interfaces	6. 最初と最後の頁 2101954 ~ 2101954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/admi.202101954	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 Kojima Atsuhiko, Nakao Juki, Shimada Naohiko, Yoshida Naoki, Abe Yota, Mikame Yu, Yamamoto Tsuyoshi, Wada Takehiko, Maruyama Atsushi, Yamayoshi Asako	4. 巻 8
2. 論文標題 Selective Photo-Crosslinking Detection of Methylated Cytosine in DNA Duplex Aided by a Cationic Comb-Type Copolymer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 xyz-xyz
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.2c00048	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 Nakao Juki, Mikame Yu, Eshima Honoka, Yamamoto Tsuyoshi, Dohno Chikara, Wada Takehiko, Yamayoshi Asako	4. 巻 -
2. 論文標題 Unique Crosslinking Properties of Psoralen Conjugated Oligonucleotides Developed by Novel Psoralen <i>N</i> -Hydroxysuccinimide Esters	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ChemBioChem	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/cbic.202200789	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Masahito Inagaki, Nozomu Ishiwata, Ryota Azuma, Masaki Nishijima, Hironori Hayashi, Yasuyuki Araki, Eiichi Kodama, Takehiko Wada
2. 発表標題 Novel Design Strategy of DNA-Artificial Nucleic Acid Chimera Toward Enhancement of Target RNA Cleavage Activities: Application for COVID-19 Therapeutics
3. 学会等名 ISNAC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Nishijima, Nagisa Kanazawa, Misaki Kawai, Sota Toyooka, Yuta Fujishiro, Tadashi Mori, Yasuyuki Araki, Yoshihisa Inoue, Takehiko WADA
2. 発表標題 Photochirogenesis of 2-Anthracene Carboxylate and 2,6-Anthracene Dicarboxylate mediated by Serum Albumin as Chiral Reaction Nanoreactor
3. 学会等名 MRM2021 (Materials Research Meeting) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehiko WADA,
2. 発表標題 DNA-artificial nucleic acids chimeric engineering strategy for enhancement of RNA cleavage function utilizing RNaseH
3. 学会等名 PACIFICHEM2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehiko WADA, Presenter; Masahito Inagaki; Akira Yano; Tsuyoshi Yamamoto; Seiya ISHIZAWA; Satoru Ishibashi; Masaki NISHIJIMA; Yasuyuki ARAKI; Satoko Suzuki; Asako Yamayoshi; Takanori Yokota
2. 発表標題 Novel design strategy of XNA for enhancement of target RNA cleavage activities with RNaseH and therapeutic effects
3. 学会等名 PACIFICHEM2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehiko WADA, Presenter; Wijak YOSPANYA; Masaki NISHIJIMA; Yasuyuki ARAKI; Reiko ODA
2. 発表標題 Supramolecular enantio- and regioselective photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate mediated by hybrid nanofibers and antibodies in water
3. 学会等名 PACIFICHEM2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Nishijima, Masahito Inagaki, Nozomu Ishiwata, Toshiyuki Sato, Hironori Hayashi, Yasuyuki Araki, Eiichi Kodama, Takehiko Wada
2. 発表標題 13.The novel design strategy of DNA-artificial nucleic acid chimera toward enhancement of RNA cleavage activities: application for COVID-19 therapeutics
3. 学会等名 International Round Table of Nucleotide, Tucleosides, and Nucleic Acids (IRT) 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nozomu Ishiwata, Nozomu Ishiwata, Toshiyuki Sato, Hironori Hayashi, Masahito Inagaki, Masaki Nishijima, Yasuyuki Araki, Eiichi Kodama, Takehiko Wada
2. 発表標題 Remarkable Enhancement of RNaseH Mediated Target RNA Cleavage Activities Complex With Chimeric DNA-peptide Ribonucleic Acid(PRNA) – Toward the COVID-19 treatment -
3. 学会等名 2022 OTS Joint Premium Oral Session of NATSJ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 荻原充宏・和田健彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 315
3. 書名 刺激応答性高分子の開発動向	

1. 著者名 日本化学会・和田健彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 228
3. 書名 進化を続ける核酸化学	

1. 著者名 高分子学会・和田健彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 630
3. 書名 高分子材料の事典	

1. 著者名 小林修、北之園拓、和田健彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 319
3. 書名 水中有機合成の開発動向	

〔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
---------	---------

フランス	University of Bordeaux			
米国	Case Western Reserve University			