

令和元年6月18日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15175

研究課題名(和文) 発光性イリジウム錯体を用いた生体内アミノ酸DL変換のその場追跡

研究課題名(英文) In Situ monitoring of D-amino acids in biological systems by use of luminescent iridium complexes

研究代表者

佐藤 二美 (SATO, Fumi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：60205961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体におけるD-アミノ酸についてはその生理活性が大きな注目を集めている。そこでラット脳組織中の遊離アミノ酸のDL比を明らかにすることを旨とした。まず、遊離アミノ酸およびペプチド鎖中のアミノ酸残基の絶対配置を光化学的に識別するプローブを開発した。アミノ酸の絶対配置を識別する部位を付与した発光性シクロメタレート型イリジウム錯体( )を新たに合成し、それを用いたアミノ酸誘導体の光キラルセンシングやエナンチオ選択的センシングに成功した。また振動円二色性分光法を用い、D-アミノ酸分析手法を確立した。次に、ラットの小脳と大脳からアミノ酸を抽出し、それらをラベル化してHPLC法によるDL分析手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来生体中のアミノ酸はDNAの遺伝情報からL体に限られることが想定されてきたが、近年の分析技術の進歩から、D体がかかなり普遍的に見出されることがわかった。目標アミノ酸がD体である場合に限りて発光するプローブを用いて、ラットの小脳と大脳のアミノ酸のDL分析手法を確立した。D-アミノ酸が関与していると推定されている様々な生命活動(皮膚組織の再生、老化、アルツハイマーなどの疾病)などについて分子レベルからの解明につながるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The present work was motivated by the recent attention to the presence of D-amino acids in animals and also to their biological activities. It was attempted to determine the DL ratios of amino acids in the rat brain. Firstly a new type of a probe for detecting amino acids was developed on the basis of an emitting iridium(III) complex. The results may promise a possibility of developing an in situ photo-sensor of amino acids in biological systems. Secondly, for the purpose of in vivo analyses of a D-amino acid in proteins, vibrational circular dichroism (VCD) was applied for isoleucine with two chiral centers. The work provides the first experimental VCD report of isoleucine in a solid state. Thirdly the free amino acids in the cerebellum and cerebrum of rats were extracted and their DL analyses were attempted. The extracted amino acids were labelled for spectroscopic detection. The method of determining the DL ratio of a labelled amino acid chromatographically has been established.

研究分野：神経解剖学

キーワード：アミノ酸DL変換 光キラルセンシング D-アミノ酸 光学分割法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

DNA コドンから読み込まれリボソーム中で生合成されるアミノ酸はL体に限られ、このことから生体中でもアミノ酸はL体からなると考えられてきた。ところが最近、生体中のさまざまな組織中にD-アミノ酸が見出され、その存在と生理機能(加齢や疾病(アルツハイマー病など))との関係が注目されるようになった。例えば、外皮膚などの組織からの分泌物中にD-アミノ酸が結合したタンパク質あるいはペプチドオリゴマーが見出され、これらの場合におけるD体の由来やその生理活性機能が大きなテーマとなっている(W. Kakegawa et al. *Nature Neuroscience*. 14, 603-611 (2011)など)。

この分野の研究においては、絶対配置を含めたアミノ酸分子の分析手段が不可欠である。従来この目的のためには、タンパク質を分解しその後の試料に対してキラルカラムを用いたHPLCアミノ酸分析が行われてきた(N. Fujii, *J. Chromatography B*, 879, 3141 (2011))。これに対して、in vivoにおいて特定のタンパク質中のアミノ酸の絶対配置を調べることは極めて困難であり、それを達成するためのプローブは未だ得られていない。

我々はここ数年ある種のイリジウム(III)錯体が高発光性を示すことに着目し、不斉構造を有する(キラルな)イリジウム(III)錯体を合成し、それを用いた不斉識別法(キラルセンシング)の開発のための研究を行って来た(図1)(例えば、H. Huo *Nature* 2014, 515, 100 (我々の研究のレビューが引用されている(H. Sato et al. *J. Photochem. Photobiol. C* 8, 67, (2007))、H. Sato et al. *New Journal of Chemistry*, 34, 617 (2010) (Hot article に選出、アクセス数トップ 10 位内/2010年4月)、Lu et al. *Chem. Soc. Rev.*, DOI:10.1039/c5cs00246j8 (2015)(我々の研究成果の3報が詳細に紹介されている))。中でもイリジウム(III)錯体の特徴として安定なキラル構造に着目し、陽イオン性キラル錯体を用いてキラルな金属錯体の立体選択的消光を利用したセンシングに成功した(H. Sato et al. *Chem. Lett.*, 40, 63 (2011))。

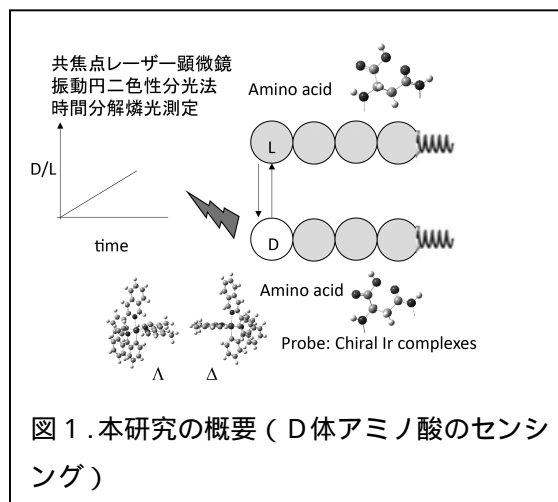


図1. 本研究の概要(D体アミノ酸のセンシング)

## 2. 研究の目的

本研究では以下の二つのことを目指した。(1)遊離アミノ酸およびペプチド鎖中のアミノ酸残基の絶対配置を光化学的に識別するプローブを開発する。具体的には、発光性金属錯体としてシクロメタレート型イリジウム錯体(III)を取り上げ、その錯体にアミノ酸の絶対配置を識別する部位を付与することを試みた。すなわち、これまで生体で使用されるプローブは特定の抗体に結合する発光性有機分子あるいは金属錯体がいられ、認識(抗体)と発光(有機分子または金属錯体)とはそれぞれ別の部位で行われているのに対し、キラルイリジウム(III)錯体は発光部位そのものが認識機能を持つため、アミノ酸の絶対配置の識別が可能である。(2)生体脳組織でD体を含むタンパク質を探索する。アミノ酸のDL分析法を検討し、生体で未だD-アミノ酸の存在が報告されていない神経細胞に対して、D体を含むタンパク質の探索を試みた。

## 3. 研究の方法

### 3.1 発光性イリジウム錯体の合成とアミノ酸キラルセンシング

アミノ酸と相互作用する可能性のあるキラルなペプチド基を付与したイリジウム錯体を新たに2種類合成した。特異的相互作用を起こさせる目的で、キラルなアミド基を持つイリジウム(III)錯体を合成した(図2)。ここで配位子としては、4,4'-bis((R)-1,2-dimethylpropyl)-aminocarbonyl)-2,2'-bipyridineを用いた。アミノ酸の配位したイリジウム錯体の合成を行い、得られた錯体の光学分割手法を確立した。配位したアミノ酸のDLに応じて、錯体の発光特性がどのようになるかを調べた。

### 3.2 振動円二色性分光法(VCD)を用いたアミノ酸分析

VCD法はキラル分子を検出する方法であり、紫外可視部に吸収のない分子に適用できるという利点があるため、アミノ酸の分析に応用することにした。しかしながらVCD法はそのシグナルの強度が極めて小さいことが欠点であるため、本研究ではD-アミノ酸の検出のために、KBr錠剤を用いた固体VCD法の適用を検討した。

### 3.3 ラット脳における遊離アミノ酸のDL分析

このテーマに対する研究内容としては、(i)ラット脳の小脳と大脳からアミノ酸を抽出し、(ii)それらをスペクトル測定のために最適なラベル化剤によってラベル化し、(iii)疎水性カラムを用いたHPLC法によって各種アミノ酸を分離精製し、最終段階として(iv)キラルカラム

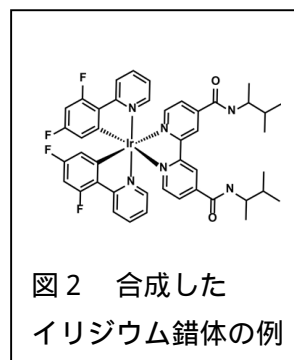


図2 合成したイリジウム錯体の例

用いた HPLC 法によって D 体と L 体の比を求めることを行った。

## 4. 研究成果

### 4.1 キラルイリジウム錯体を用いたアミノ酸センシング

発光性イリジウム(III)錯体に対するアミノ酸のキラルセンシングを調べた。イリジウム錯体の光学分割よりキラルな $\Delta$ 体、 $\Lambda$ 体のイリジウム錯体を得た。このようにこの錯体は中心金属まわりの配位異性と配位子の不斉炭素の2つのキラルリティを有している。アミノ酸分子との DL-トリプトファンメチルエステル(DL-Tyr-Me)において顕著な消光作用がみられた。これは、トリプトファンの側鎖のインドール基がエネルギーを受けとる役割をするためであると推定した。アミノ酸エステルによる消光作用が現れるためには、発光錯体の寿命がある程長いことが必要条件であることがわかった。さらに R-あるいは S-ジニトロベンゾイル化アラニンメチルエステル(R- or S-DNB-Al-Me)を消光剤として、エナンチオ選択性が表れることがわかった(図3)。ここから DNB-Al-Me 分子が発光性錯体に近づくときに、消光作用のある dinitrobenzoyl 基とプロペラ状に配位した三つの配位子、および配位子側鎖のキラルな aminocarbonyl 基とが同時に相互作用してキラル識別が可能になることが推論された。ここでみられたようなエナンチオ選択性はわずかなエネルギー差に起因すると考えられる。このような場合には温度(熱運動)の影響を受けることが予想される。そこで、温度依存性を調べた。温度の低下とともに消光作用は増大するが、その程度はより高い消光作用を示す組合せのほうが大きく、結果としてエナンチオ選択性は低温程、顕著になることがわかった。次に、エナンチオ選択性を過度光測定によって調べた。この結果からも、DNB-Al-Me が消光剤として働き、錯体の発光寿命を短くすることがわかった。しかも R-DNB-Al-Me の方が S-DNB-Al-Me よりも大きくエナンチオ選択性が表れることを示している。この結果は、定常光を用いた実験とよく一致した。以上のように、今回新たに合成した発光性イリジウム(III)錯体においては、Ir(III)イオンの周りのキラルリティ( )と配位子に結合した aminocarbonyl 基のキラルリティ(R, S)の両者の協同的な作用によって、アミノ酸へのエナンチオ選択性が表れることがわかった( *New J. Chem.* 41, 2780-2785 (2017) )。

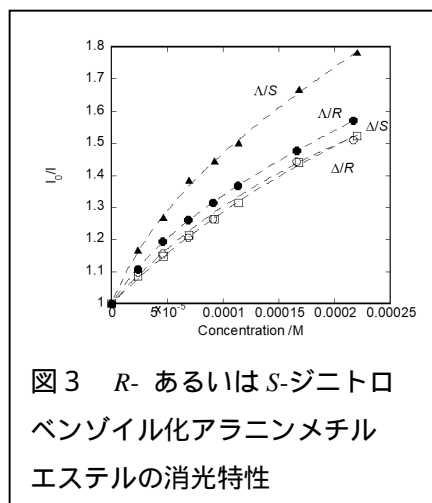


図3 R-あるいはS-ジニトロベンゾイル化アラニンメチルエステルの消光特性

### 4.2 振動円二色性分光法を用いたアミノ酸分析

単体のアミノ酸のキラルリティ分析に対する振動円二色性分光法(VCD)法の有効性を検討した。この手法をアミノ酸に適用する場合には、アミノ酸が水溶媒にしか溶けないという問題が生じた。そこで、発想を変えて、まず、固体状態での測定を試みることにした。しかしながら、固体状態の測定では、直線二色性による偽シグナルの影響などもあり、真のシグナルの検証が困難である。このため反対のエナンチオマーで対称なシグナルが得られること、透明なサンプルを作成できること、ラセミ体ではシグナルがでないこと、サンプルを回転させてもシグナルが反転しないことなどで検証をおこなった。ここでは2つのキラルセンターをもつイソロイシンの分子構造の解析に挑んだ。その結果、イソロイシンは良好なシグナルが得られることがわかった。その結果、イソロイシン中の二つの不斉炭素に由来する VCD 吸収の符号がそれぞれ独立には決まらず、両者のキラルリティに相互依存していることがわかった(図4)。これはペプチド中のアミノ酸の **RS** を同定する上で、着目する分子の VCD 吸収の符号に対して隣接したアミノ酸のキラルリティが影響を与える可能性があることを示している。通常感度がわるく微弱シグナルである VCD シグナルをきれいに測定できたことも一因として、今回 Editor's Choice ということで受理された( *Chem. Lett.*, 46, 449, (2017) )。

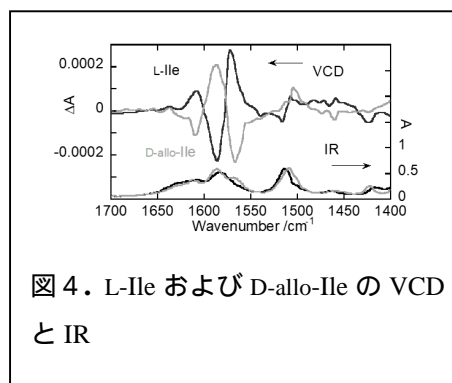


図4 L-Ile および D-allo-Ile の VCD と IR

### 4.3 ラット脳内の遊離アミノ酸の DL 分析

まずラットの脳(小脳、大脳)をホモジナイズ後に水を用いて遊離アミノ酸の抽出を行った。試料は -4 °C で冷凍保管した。並行して、アミノ酸分子のスペクトル分析における検出のために各種ラベル化剤を用いたラベル化を検討した。その結果、ラベル化剤としては、4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F と略称)が最適であることが解った。水・アセトトリル混合溶媒中でホウ酸緩衝液を加えてラベル化反応を起こさせた。この試薬の問題点としては、アミノ酸との反応によらなくてもホウ酸緩衝液中で自発的に反応が起こり、ラベル化ア

ミノ酸と類似の吸収スペクトルを示すことがある。それ故、次に述べるアミノ酸の HPLC 分析ではこの点に特に注意した。

次に逆相カラムを用いてラベル化アミノ酸の分析方法を確立した。カラムとして TSK-gel CDS-100Z (TOSOH) を用い、リン酸水溶液、アセトニトリル、メタノールの比率を変えるグラジエント法によって分析した。ラベル化したヒスチジン、グルタミン、セリン、グルタミン酸およびアラニンの混合液を注入したときのクロマトグラムを図5に示した。図5でXと示したのはアミノ酸と反応しなかった NBD-F の生成物である。グルタミン酸はXの直後に遊離してくるので、逆にこのことからグルタミン酸の同定が容易となることに着目した。

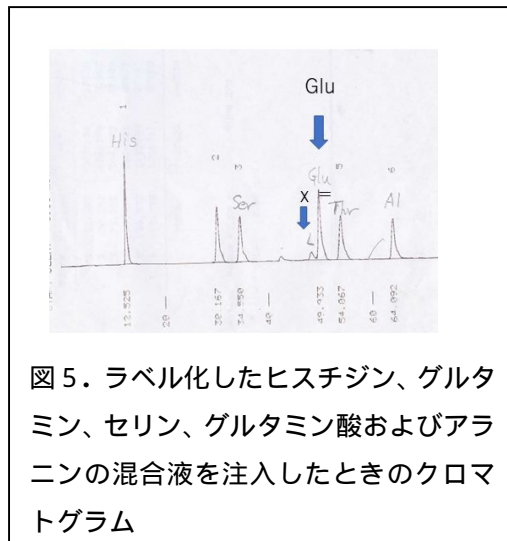


図5. ラベル化したヒスチジン、グルタミン、セリン、グルタミン酸およびアラニンの混合液を注入したときのクロマトグラム

続いてラベル化アミノ酸の DL 分析のために、キラルカラムを用いた分割法を検討した。その結果、カラムとしては SUMICHIRAL OA-3200R (SUMICA)、溶離液としてはクエン酸メタノールによって各種アミノ酸の分割を達成した。ラベル化グルタミン酸のキラルカラムによる光学分割においては、最初のピークがL体、次のピークがD体であった。溶離初期のバンドはアミノ酸と反応しなかった NBD-F の生成物に起因した。

現在、以上の結果を基に、生体試料中のアミノ酸の DL 分析（とくにグルタミン酸に着目）を進めている。今後は得られた結果をさらに発展させて、種々の環境下（加齢、ストレス等）におけるラットに対して分析を行い、脳中のアミノ酸について DL の生理活性に対する影響を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

Yoshikhisa Ishihara, Takaichi Fukuda\*, and Fumi Sato, Internal Structure of the Rat Subiculum Characterized by Diverse Immunoreactivities and Septotemporal Differences. *Neurosci Res.* (in press) DOI: 10.1016/j.neures.2019.02.001 (open access) (査読有)

Hisako Sato\*, Fumi Sato and Akihiko Yamagishi, Chiral Tectonics: VCD and ECD Application for Epimerization of a Star-burst Tetranuclear Complex with a Labile Central Core. *Inorganics*, 6, 70(10page) (2018) DOI:10.3390/inorganics6030070 (open access) (査読有).

Kazuyoshi Takimoto, Kenji Tamura, Yutaka Watanabe, Akihiko Yamagishi, and Hisako Sato\*, Microscopic Chiral Pockets in Tris(chelated) Iridium(III) Complex as Sites for Dynamic Enantioselective Quenching. *New J Chem*, 42, 4818-4823 (2018) DOI: 10.1039/C7NJ04688J (inside front cover) (査読有).

Hisako Sato\*, Kenji Tamura, Tomoko Yajima, Fumi Sato, and Akihiko Yamagishi, Chiral Phosphorescent Probes for Amino Acids: Hybrids of Iridium(III) Complexes with Synthetic Saponite. *New J Chem*, 41, 2780-2785 (2017) DOI: 10.1039/C6NJ03777A (査読有).

Hisako Sato\*, Izuru Kawamura, Akihiko Yamagishi, and Fumi Sato, Solid State VCD Spectra of Isoleucine and its Related Compounds: Effects of Interplay between Two Chiral Centers. *Chem Lett*, 46, 449-452 (2017) (Editor's Choice に採択) DOI: 10.1246/cl.161043 (査読有).

その他 14 報

〔学会発表〕(計 31 件)

石原義久、星秀夫、高柳雅朗、川島友和、佐藤二美、背側海馬台の観察に適した切片作製法：冠状断・矢状断・長軸直交断切片の細胞構築比較。第 124 回日本解剖学会全国学術集会 日本歯科大学新潟生命歯学部 2019 年 3 月

佐藤久子、瀧本和誉、山岸皓彦、陽イオン性金属錯体への振動円二色性分光法の応用。MC2018 (モレキュラーキラリティ 2018) 千葉大学 2018 年 5 月

佐藤久子、瀧本和誉、山岸皓彦、振動円二色性分光法による固体表面における不斉識別機構の解明。日本化学会第 98 春季年会(2018) 2018 年 3 月 日本大学

星秀夫、川島友和、高柳雅朗、石原義久、佐藤二美、キンギョ網膜 displaced 型神経節細胞と方向選択制アマクリン細胞のシナプス。第 123 回日本解剖学会全国学術集会 日本医科大学 2018 年 3 月

Hisako Sato, Kazuyoshi Takimoto, Jun Yoshida, Akihiko Yamagishi, Application of Vibrational Circular Dichroism to Chiral Iridium and Ruthenium Complexes. 第 67 回錯体化学討論会 北海道大学 2017 年 9 月

山岸皓彦、佐藤久子、北澤孝史、佐藤二美、イリジウム(III)錯体とアミノ酸との相互作用 .  
第 66 回錯体化学討論会 福岡大学 2016 年 9 月  
その他 25 件

〔図書〕(計 2 件)

Hisako Sato and Akihiko Yamagishi, Surface and Interface Chemistry of Clay Minerals, Chapter 6:  
From Transition Metal Ion Complexes to Chiral Clay Minerals, p173-193 Elsevier (2018) 総ペ  
ージ 426 Paperback ISBN: 9780081024324

Hisako Sato and Akihiko Yamagishi, Inorganic Nanosheets and Nanosheet-Based Materials:  
Fundamentals and Applications of Two-Dimensional Systems. Chapter 20: Chirality and its  
Application, p483-500 Springer (2017) 総ページ 542 ISBN:978-4-431-56494-2

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東邦大学 教育・研究業績データベース

<https://gyoseki.toho-u.ac.jp/thuhp/KgApp>

愛媛大学教育研究者要覧

<http://yoran.office.ehime-u.ac.jp/profile/ja.fb2f237dd556c9a760392a0d922b9077.html>

愛媛大学大学院理工学研究科(理学系) 環境機能科学専攻複合体化学研究室

<http://chem.sci.ehime-u.ac.jp/~comchem1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 山岸 皓彦

ローマ字氏名: ( **YAMAGISHI, Akihiko** )

所属研究機関名: 東邦大学

部局名: 医学部

職名: 非常勤研究生

研究者番号: **70001865**

研究分担者氏名: 佐藤 久子

ローマ字氏名: ( SATO, Hisako )

所属研究機関名: 愛媛大学

部局名: 理工学研究科(理学系)

職名: 教授

研究者番号: 20500359

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。