

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21750164

研究課題名 (和文) 時間分解円二色性によるDNA-色素間相互作用の動的挙動解析

研究課題名 (英文) Development of time-resolved circular dichroism measurement and its application to the detection of conformational dynamics in DNA-ligand complex

研究代表者

荒木 保幸 (ARAKI YASUYUKI)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：80361179

研究成果の概要 (和文) : DNA がキラルであり、DNA-薬剤間で相互作用することにより生じた分子全体がキラリティを有することに着眼し、この DNA-薬剤相互作用の動的挙動を円二色性測定法に時間分解能を付与することで検出することを試みた。時間分解能を付与した円二色性測定法を新たに開発することに成功し、薬剤をレーザー誘起することによって生じる DNA-薬剤相互作用の動的挙動をマイクロ秒の時間スケールで検出することに成功した。

研究成果の概要 (英文) : We aimed to develop the time-resolved circular dichroism measurement for the purpose of the detection of the dynamic behavior of this DNA-drug interactions, focusing on an entire chirality occurring as a result of DNA-drug interaction. We have successfully developed it and detected the dynamic behavior of DNA-drug interactions caused by the laser-induced conformational change of DNA-drug complexes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能関連化学

## 1. 研究開始当初の背景

DNA と直接結合し、高い抗癌活性や生理活性を示す化合物が広く知られている。これら薬物の薬効発現機構の解明は、より優れた薬剤開発や発病過程の解明のためにも非常に重要で、詳細な検討が行われ、現象論的にはその作用機状なども明らかとされているとともに、高速分光法 や分子動力学計算などからの取り組みも行われつつある。しかし、これら DNA・RNA 結合性薬物において、初期過程かつ最も基本的な性質であるターゲット二重らせん核酸 (dsDNA) との動的な相

互作用解析については、意外にも現在でも明らかにされているとは言えない。dsDNA-薬物間の初期的かつ動的な相互作用の解明は、薬物の塩基配列特異的認識・結合挙動解明にとって極めて重要であり多くの研究者により取り組んでこられたが、未だ解明できていない最も大きな原因は、薬物と dsDNA との相互作用を感度よく検出・解析可能な円二色 (CD) スペクトルの時間分解能の低さであった。CD スペクトルによる実時間測定法の開発は、上記 dsDNA 結合性薬物の基礎的性質解明だけでなく、核酸化学や分子生物学の

みならず、新規抗癌剤開発など多くの分野から切望されている重要なテーマである。

これらは、DNA-カチオン性色素の会合が存在する状態を出発点として、その相互作用の揺らぎを検出することが可能であるが、蛍光検出単独ではDNAと色素の結合様式（インターカレーション、メジャーまたはマイナグループへの結合）が一意に決定できず、別途色素の光吸収に誘起されるCD測定を行いその符号や波長シフトから結合様式を特定する必要がある。一方、CD測定においては、上記したように時間分解能から、結合様式の時間変化の情報が得られない。以上の観点から、どのような時間スケールで、DNA-カチオン性色素間の結合様式が色素のCDを誘起するのかという情報が決定的に不足していると考えられる。

我々は、ピコ秒からミリ秒に及ぶ広範囲の時間領域での過渡吸収測定により、機能性分子から生体関連分子までの幅広い物質系で光誘起後に起こる分子の挙動の詳細な研究を行ってきた。過渡吸収法は、生体関連物質に含まれる特有の色素に見られる時間変化の詳細を明らかにする事が出来るが、生体関連物質の構造と色素の相互作用をそのスペクトル形状から完全に議論することが難しい。特に、DNA-カチオン性色素間の相互作用では、上記の蛍光検出系と同様に、スペクトル形状変化やスペクトルシフトから結合様式の議論をする事が難しいと考えられる。従って、我々はこれまでの過渡吸収法を円二色性の時間変化検出へと発展させることで、上記の問題点を克服する。これまで、我々はマイクロ秒の時間分解能を有する時間分解円二色性測定装置のプロトタイプをすでに構築しており、不斉なポルフィリン二量体の光励起後における円二色性変化の測定に成功している。

## 2. 研究の目的

ストップフロー法を用いたサブミリ秒の時間分解能を有する円二色性測定装置の構築のため、Kligerらの先駆的な研究例を元に、これまで我々が構築してきたサブマイクロ秒の時間分解能を有する時間分解円二色性測定装置をさらに高感度化させ低濃度の生体試料検出へと改良を進めるとともに、ストップフロー装置を組み込む事で、DNAバッファ水溶液とカチオン性色素水溶液の2液混交系において、カチオン性色素の誘起CD発現の実時間測定が可能な装置へと改良を行う。また、液体混合時間を最適化することにより時間分解能を向上させ、サブミリ秒～マイクロ秒の時間分解能を目指す。一方、光線力療法で使用されているポルフィリン類を例にとり、光誘起によって引き起こされるであろう、DNA-ポルフィリン錯体の構

造変化検出を、レーザーフラッシュホトリシス法と本研究の円二色性測定法を組み合わせることで高い時間分解能での検出を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 高い時間分解能を有する円二色性測定装置の構築

現有設備であるナノ秒レーザーフラッシュホトリシス装置を改良し、レーザーフラッシュホトリシス法で用いるモニター光を楕円偏光とし、サンプルにおいて引き起こる円二色性に由来する楕円偏光の楕円率変化を高感度で検出する、マイクロ秒の時間分解能を有する円二色性測定装置を構築する。

サブミリ秒の時間分解能を達成するには、フラッシュホトリシス法で用いる検出器

(Image Intensifier)へのゲート幅をコントロールする事で原理的には可能であるが、これにストップフロー装置を新たに組み込む場合、ストップフロー段階での2液混合速度が最終的な時間分解能を決定すると考えられる。

### (2) カチオン性色素の誘起CDを通じたDNA構造変化の実時間測定

dsDNAと結合したカチオン性色素を光励起すると、蛍光を発し緩和する過程のほかにDNA塩基部と光誘起電子移動を行うようなケースが報告されている。光誘起電子移動により生じた色素のイオンラジカルは、その基底状態との電子状態・分子構造の点から別分子であり、DNA-カチオン性色素複合分子の構造変化を誘起する可能性がある。構造変化は時間分解円二色性により検出可能であると考えられる。特にポルフィリン類は、グアニンの電子移動が報告されているなど、本テーマを推進する上で基本的な系であると考えられる。

## 4. 研究成果

### (1) 楕円偏光を利用した円二色性の高感度化と時間分解円二色性測定法への応用

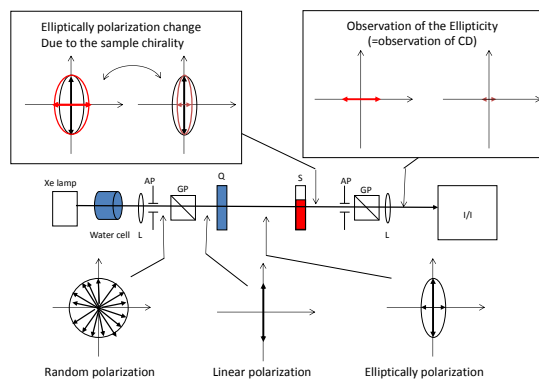


図1 楕円偏光を利用した円二色性測定

ランダム偏光である Xe ランプをレンズとピンホールによりコリメートし、これを Glan laser prism を通すことで直線偏光へと変換する。円二色性を測定するためには、直線偏光を  $\lambda/4$  板により左右円偏光とし、サンプルへと導き左右円偏光の吸収差を検出する。直線偏光を物理的に歪ませた石英板 (Q) を通し楕円偏光を作成し、キラルなサンプルで誘起される楕円偏光の楕円率変化を、クロスニコルに配置した Glan-laser prism により測定、解析することで CD スペクトルを得る手法が提案されている。この手法は、石英板による楕円率の測定をあらかじめ行うことが必須であるために測定に煩雑が増すが、高感度に CD の検出が可能であることが示されており、実際我々の事前の実験でもたしかめられている。本研究ではこの手法をさらに高感度化するための工夫として、モニター光 (Xe lamp) 強度が信号の S/N 比を現実的に決定するため、最終的に検出器に到達する楕円偏光のロスを最小限とするため、大口径のレンズ及び Glan-laser prism の使用が必要不可欠であった。

## (2) カチオン性色素の誘起 CD を通した DNA 構造変化の実時間測定

カチオン性色素として、DNA と相互作用するポルフィリン (H<sub>2</sub>TMPyP) は、二重らせん DNA と塩基配列選択的に相互作用することが知られており、また、光線力学療法における光増感剤としての応用が期待されている分子である。

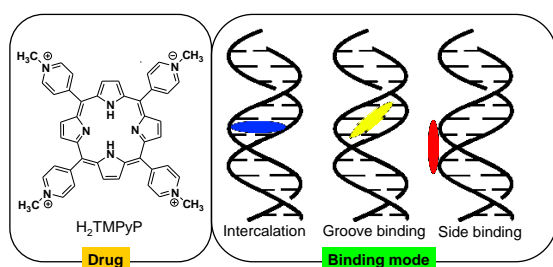


図2 H<sub>2</sub>TMPyP と DNA との相互作用

われわれは、H<sub>2</sub>TMPyP が DNA と相互作用し錯体を形成している状態で、H<sub>2</sub>TMPyP を光励起することで、DNA 中のグアニンと H<sub>2</sub>TMPyP 間での光誘起電子移動を引き起こし、その結果 DNA-H<sub>2</sub>TMPyP 錯体の構造変化が引き起こることを、本研究で開発した時間分解能を付与した円二色性測定手法により検出することに成功した。(図3)

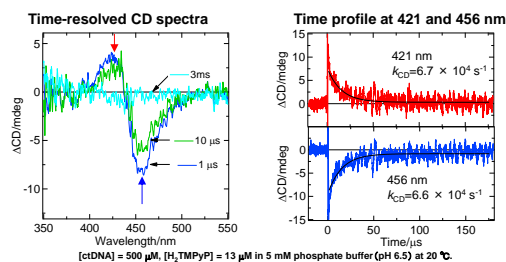


図3 DNA-H<sub>2</sub>TMPyP 錯体において観測されたマイクロ秒領域での CD の時間変化

この結果は、光励起された H<sub>2</sub>TMPyP がいったん DNA からかい離し、マイクロ秒の時間スケールで再結合する過程を示している。本研究により、これまで定常状態でのみ検討されてきた DNA-薬剤錯体の動的側面が原理的に CD の時間分解測定から明らかにできることが示された。今後は、ポルフィリン類のみではなく、さまざまな薬剤と DNA との相互作用が本研究を発展させていくなかで明らかとすることができ、その結果を、DNA-薬剤間相互作用の詳細な検討から、新規薬剤開発へとつなげられるものと期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Fullerene- and Pyromellitdiimide-Appended Tripodal Ligands Embedded in Light-Harvesting Porphyrin Macrorings  
Kuramochi, Y.; Araki, Y. (他4名、4番目)  
Inorg. Chem., 50, 2011, 10249-10258. 査読有
- ② Multiple photosynthetic reaction centres composed of supramolecular assemblies of zinc porphyrin dendrimers with a fullerene acceptor  
Fukuzumi, S.; Saito, K.; Ohkubo, K.; Kashiwagi, Y.; Araki, Y. (他6名、9番目)  
Chem. Commun., 47, 2011, 7980-7982. 査読有
- ③ Axle Length Effect on Photoinduced Electron Transfer in Triad Rotaxane with Porphyrin, [60]Fullerene, and Triphenylamine  
Sandanayaka, A. S. D.; Sasabe, H.; Araki, Y.; (他4名、3番目)  
Journal of Physical Chemistry A (2010), 114(16), 5242-5250. 査読有

- ④ The effect of atomic nitrogen on the  $C_{60}$  cage  
Nikawa, H.; Araki, Y. (他8名、2番目)  
Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom) (2010), 46(4), 631-633. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① Ellipticity-change-detected CD apparatus toward the application to the DNA/RNA conformational change  
Yasuyuki Araki, Makoto Murakami, Yoshiki Hamada, Seiji Sakamoto, Takehiko Wada  
The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011) Nov. 9(Wed.)~11(Fri.), 2011  
Clark Memorial Student Senter, Hokkaido University, Sapporo, Japan
- ② 円二色性の高感度検出へ向けた楕円率変化検出型円二色性測定法  
荒木 保幸・村上慎・濱田芳生・坂本清志・和田健彦  
2011年光化学討論会  
平成23年9月6日(火)~8日(木)  
宮崎市河畔コンベンションセンター
- ③ 楕円率変化検出による円二色測定法のフォトンカウンティング法による高感度化  
荒木 保幸・村上慎・坂本清志・和田健彦  
第91回日本化学会春季年会  
平成23年3月26日(土)~29日(火)  
神奈川大学横浜キャンパス
- ④ New approach of time-resolved CD experiment for a biological application.  
Y. Araki; M. Murakami; S. Sakamoto; T. Wada  
Pacifichem2010, Honolulu, Hawaii, USA, Dec. 15-20, 2010
- ⑤ 不斉軸配位子による亜鉛ポルフィリン6量体の不斉誘起とその光励起挙動  
荒木 保幸・村上慎・坂本清志・和田健彦・SANDANAYAKA Atula・RABBANI Mohammad・羽曾部卓  
2010年光化学討論会、平成22年9月8日-10日、千葉大学
- ⑥ 光励起をトリガーとするDNA・カチオン性ポルフィリン錯体の動的挙動変化の時間分解CD測定法を用いた解析

村上慎・荒木保幸・坂本清志・和田健彦  
2010年光化学討論会、平成22年9月8日-10日、千葉大学

- ⑦ TIME-RESOLVED CIRCULAR DICHROISM STUDY OF BINDING DYNAMICS OF H<sub>2</sub>TMPYP WITH DNA IN MICROSECOND TO MILLISECOND TIME-SCALE  
Yasuyuki Araki, Makoto Murakami, Seiji Sakamoto, Takehiko Wada  
22nd International Symposium on Chirality, Sapporo, Japan from July 12 to 15, 2010
- ⑧ 高時間分解CD測定装置を用いた二重らせんDNA-porphyrin間相互作用解析(東北大多元研)村上慎・荒木保幸・坂本清志・和田健彦  
日本化学会第90春季年会(2010)、平成22年3月26日(金)~29日(月)、近畿大学本部キャンパス
- ⑨ トリフェニレンをコアとする亜鉛ポルフィリン6量体の不斉軸配位子による不斉誘起とその光励起挙動(東北大多元研・北陸先端大)、荒木 保幸・Atula, Sandanayaka・Rabbani, Mohammad・羽曾部卓・村上慎・坂本清志・和田健彦  
日本化学会第90春季年会(2010)、平成22年3月26日(金)~29日(月)、近畿大学本部キャンパス

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 円二色性測定装置  
発明者: 荒木保幸、和田健彦、和田明生  
権利者: 日本分光株式会社  
種類: 特許権  
番号: 特願2010-190514  
出願年月日: 平成22年8月27日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 保幸 (ARAKI YASUYUKI)  
東北大学・多元物質科学研究所・助教  
研究者番号：80361179

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：